

Aus der Kinderklinik der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Die Wertigkeit der Alpha-Fetoprotein-Bestimmungen
bei Kindern und die praktische Durchführung
derselben mittels Radioimmunassay**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin —

vorgelegt von
Alfons Roeser
aus Engers

Mainz 1981

1982
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Die Wertigkeit von Alpha-Fetoprotein-Bestimmungen
bei Kindern und die praktische Durchführung der-
selben mittels Radioimmunassay

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin der
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Alfons Roeser
aus Engers

Mainz 1981



Dekan:	Prof. Dr. K.-H. Bässler
1. Gutachter:	Prof. Dr. W. Schönberger
2. Gutachter:	Prof. Dr. W. Baumann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. MAI 1982

A.)	BEDEUTUNG VON ALPHA-FETOPROTEIN	1
I.)	EINLEITUNG	1
1.)	Überblick über Alpha-Fetoprotein	1
2.)	Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	4
II.)	ZUSAMMENFASSUNG DES STANDS DER AFP-FORSCHUNG	5
1.)	Geschichtliches	5
2.)	Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
3.)	Biochemische Eigenschaften und physiologische Bedeutung des AFP	9
4.)	Nachweismethoden	10
5.)	Wertigkeit in der Schwangerschaft	11
6.)	Wertigkeit bei malignen Tumoren	12
7.)	Wertigkeit bei nicht-malignen Erkrankungen	14
B.)	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
I.)	DURCHFÜHRUNG DER AFP-BESTIMMUNGEN	16
1.)	Material und Methoden	16
2.)	Beschreibung der Radioimmunassays	17
3.)	Beschreibung der Messapparatur	31
4.)	Probenentnahme und Aufbewahrung	33
II.)	LABORTECHNISCHE UNTERSUCHUNGEN	34
1.)	Grundgrößen des Radioimmunassay	34
2.)	Intraassayvarianz und Interassayvarianz	42
3.)	Recovery Test	44

4.)	Einfluss des mehrmaligen Einfrierens der Seren auf die AFP-Werte	48
5.)	Verdünnungstest	50
6.)	Variation der Konzentration von markiertem Antigen, Antikörper, Antigen, Polyäthylenglykol und der Messzeit	56
7.)	Abhängigkeit der PEG-Fällung von unterschiedlichen Plasmaproteinkonzentrationen	61
8.)	Vergleich der Kits der Firmen Behringwerke und Abbott	66
III.)	PHYSIOLOGISCHE AFP-KONZENTRATIONEN	69
1.)	AFP-Normalwerte bei 2 - 15-jährigen Kindern	69
2.)	Änderung des AFP-Spiegels in den ersten beiden Lebensjahren	73
3.)	AFP und Bilirubin bei Neugeborenen	75
4.)	AFP-Halbwertszeit bei Neugeborenen	77
IV.)	ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	80
1.)	Patienten mit Lebererkrankungen	80
2.)	Patienten unter Zytostatikatherapie	87
3.)	Patienten mit Mukoviszidose	94
4.)	Patienten mit Turner Syndrom	96
5.)	Patienten unter hochdosierter Sexualhormontherapie	97
6.)	Patienten mit Spina bifida	99
C.)	D I S K U S S I O N	100
I.)	BEWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	100
1.)	Diskussion der labortechnischen Resultate	100
2.)	Diskussion der physiologischen AFP-Konzentrationen	102
3.)	Diskussion der klinischen Ergebnisse	103
II.)	ZUSAMMENFASSUNG	105
D.)	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	107

A.) BEDEUTUNG VON ALPHA-FETOPROTEIN

I.) EINLEITUNG

1.) Überblick über Alpha-Fetoprotein

Alpha-Fetoprotein (Synonyme: AFP, α FP, alpha-1-Fetoprotein, ESA-Globulin, F-Protein, Fetales- α -globulin, α_1 -Feto-spezifisches Serum Protein, Feto-protein, α_F -Globulin) ist eines der etwa 20 bisher bekannten, sogenannten embryonalen oder embryo-spezifischen Proteine. Diese Proteine werden charakteristischerweise von fetalen Zellen gebildet und sind nach der Geburt nur noch in Spuren im Serum nachweisbar (123). Einige dieser Proteine können jedoch von malignen Tumoren erneut synthetisiert und ins Serum ausgeschwemmt werden. Daher bezeichnet man sie auch ganz allgemein als onkofetale, karzino-fetale oder karzinoembryonale Antigene.

Die bekanntesten Fetalantigene sind: Das Carcino-embryonic-antigen (CEA), das bereits erwähnte alpha-Fetoprotein (AFP), das β -1-Fetoprotein, das fetale Sulfoglycoprotein, das β -2-Fetoprotein, das α_2 -H-Globulin (Isoferritin), das human-chorionic-gonadotropin (HCG), das Regan-Isoenzym der alk. Phosphatase, das T-Globulin, das γ -Fetoprotein, das Fetogliale Antigen und das Fetopankreatische Antigen (124).

AFP ist ein saures alpha-1-Glykoproteid mit einem Molekulargewicht um 65.000 (13, 141, 157, 158, 181). Es wird physiologischerweise in der Fetalperiode gebildet und ist etwa ab der 4. Schwangerschaftswoche im embryonalen Serum nachweisbar (77, 198). Seine höchste Konzentration (3 - 4 mg/ml) erreicht es um die 13. - 15. Entwicklungswoche im Fetalserum (73, 195), um dann gegen Ende der Schwangerschaft wieder auf Werte zwischen 50 - 150 μ g/ml abzufallen (31, 97). Während der Schwangerschaft kann es diaplazentar

auf die Mutter übergehen und dann auch im mütterlichen Serum nachgewiesen werden; im Fruchtwasser ist es in einer sehr viel höheren Konzentration nachweisbar (83). Die höchste Konzentration im mütterlichen Serum wird im Gegensatz zum Feten erst um die 32. Schwangerschaftswoche gefunden (73), wobei als höchste noch im Normbereich liegende Konzentration zu diesem Zeitpunkt 530 ng/ml angesehen wird (200). Bei gestörter Gravidität kann AFP noch höher als der physiologischen Konzentration entsprechend ansteigen. Vor allem Missbildungen der Neuralleiste (Meningomyelozele, offene Spina bifida, Anenzephalie) sowie Abortus imminens und Hydramnion, aber auch zum Teil feto-materne Transfusion, Oesophagusatresie und kongenitale Nephrose gehen mit einem erhöhten AFP-Spiegel im Fruchtwasser und eventuell auch im mütterlichen Serum einher (40, 42, 73, 83, 110, 164, 176, 183, 195, 196, 198). Das AFP ist bereits etwa 4 Wochen nach der Geburt nur noch mit empfindlichen radio-immunologischen Methoden im Serum nachweisbar (44, 71, 86, 144, 179, 196, 198). Beim gesunden Erwachsenen läßt sich mit dieser Methode je nach Messtechnik ein Spiegel zwischen 2 und 25 ngAFP/ml Serum finden (51, 145, 179, 183, 184).

Pathologischerweise tritt AFP in hohen Konzentrationen (bis 10 mg/ml bzw. bis 130 mg/ml) wieder beim primären Leberzellkarzinom (1, 2, 72, 102, 115, 139, 180, 185), bei malignen Teratoblastomen (3, 73, 149, 226) sowie endodermalen Sinustumoren auf (21, 213, 217, 231).

In viel geringeren Konzentrationen wurden AFP Titeranstiege unregelmäßig noch bei folgenden Krankheiten beobachtet: Akuter Virushepatitis (2, 73, 168), chronisch-aggressiver Hepatitis (73, 132), chronisch-persistierender Hepatitis (2, 73, 122, 132), alkoholischer Hepatitis (122, 151), drogeninduzierter Hepatitis (16, 205), verschiedenen Formen der Leberzirrhose (73, 171, 205), Hämochromatose (122, 190), Gallengangsläsionen und Verschluss-

ikterus (16), Ataxia teleangiectatica (206, 207, 229), Tyrosinose (26, 27, 44), Mukoviszidose (50, 208) und Indischer Kinderzirrhose (48, 155). Selten wurde in einzelnen Fällen auch eine Erhöhung des AFP-Spiegels im Serum bei folgenden Erkrankungen gefunden: Mononucleose, Down Syndrom, Sklerodermie, systemischen Lupus erythematoses, Dermatomyositis, weiteren "Kollagenosen" und α_1 -Antitrypsinmangel (6, 73).

Einzelfallbeschreibungen liegen vor über eine AFP-Produktion von Lebermetastasen eines Kolon und Pankreas Karzinoms sowie dem Gewebe eines Magenkarzinoms (18, 108).

2.) Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Die Aufgabenstellung der Arbeit bestand darin, den neu entwickelten Radioimmunassay der Firma Behringwerke auf seine klinische Anwendbarkeit, Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit, Präzision und Richtigkeit in klinischen Labors zu prüfen. Weiterhin sollte dieser Immunassay mit einem anderen auf dem Markt befindlichen Assay der Firma Abbott in bezug auf Handhabbarkeit und Übereinstimmung der Ergebnisse verglichen werden.

Ausserdem wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig Normalwerte für AFP im Serum bei Kindern zwischen dem 2. und 15. Lebensjahr mit dem Radioimmunassay bestimmt, sowie der Einfluß von Zytostatika auf eine eventuelle Neosynthese von AFP untersucht. Weiterhin wurden die bisher vorliegenden Kenntnisse über AFP bei kindlichen Lebererkrankungen, Mukoviszidose und bei Neu- und Frühgeborenen sowie Kindern bis zum zweiten Lebensjahr speziell durch die radioimmunologische Bestimmung des AFP im Blut dieser Kinder ergänzt.

II.) ZUSAMMENFASSUNG DES STANDS DER AFP-FORSCHUNG

1.) Geschichtliches

Alpha-Fetoprotein wurde inzwischen im Serum von 18 Säugetierspezies gefunden (3, 39, 117, 140, 233). Als erstem gelang es Pedersen, 1944 im fetalen Kälberserum das Fetuin nachzuweisen (172). Dieses unterscheidet sich von humanem AFP durch einen höheren Kohlenhydratgehalt (20 %), die Aminosäurezusammensetzung (ohne Methionin), das Molekulargewicht 48.400 sowie andere physikalisch-chemische Parameter (181, 211). Bergstrand und Czar fanden 1956 als erste AFP in fetalem menschlichem Serum; 1957 wurden ihre Befunde von anderen Forschern bestätigt (31, 32). 1963 konnten Abelev und Mitarbeiter ein fetales alpha-1-Globulin im Serum von erwachsenen Mäusen und Ratten nach partieller Hepatektomie und bei Mäusen mit transplantierten Hepatomen nachweisen (5). Schließlich fand Tatarinov im Jahre 1964 erstmals AFP im Serum eines erwachsenen Menschen, der ein Hepatom hatte (234). In der folgenden Zeit konnten Abelev und andere Autoren AFP auch bei malignen Teratoblastomen des Hodens und Ovars sowie nach partieller Hepatektomie beim Menschen nachweisen (3, 80, 118).

1970 isolierten Nishi und Hirai (157, 158) sowie Lehmann, Lehmann und Martini voneinander unabhängig erstmals das AFP (121, 126, 129, 130, 131).

Nishi und Hirai versetzten fetales Serum und das Serum eines Hepatom-Patienten mit einem Anti-AFP Serum vom Pferd. Dieses Antiserum wurde durch Verimpfung eines Antigen-Antikörper Präzipitates induziert, das durch Absorption von Antifetalserum von Kaninchen an gesundem erwachsenen Humanserum gewonnen wurde. Auf diese Weise gewannen sie AFP-AntiAFP Komplexe. Diese wurden gewaschen, in 0,1 m Glycine-HCl Puffer pH 1,8 gelöst, zentrifugiert, mit 0,4 m Na_2HPO_4 auf pH 7,0 neutralisiert, zentrifugiert und wiederum ge-

waschen. Anschliessend wurden die gereinigten Antigen-Antikörper Präzipitate in 0,1 m Glycine HCl Puffer bei pH 1,8 gelöst und das dissoziierte Antigen durch Gelfiltration (Sephadex-G-150) abgetrennt. Auf diese Weise erhielten sie 3 Peaks, von denen der erste dem Antigen-Antikörper Komplex entsprach, der zweite dem Antikörper und der dritte dem Antigen. Letzterer wurde gepoolt, konzentriert und nochmals einer Gelfiltration in 0,15 m Phosphat Puffer pH 7 unterworfen. Von wiederum zwei Peaks, die sie auf diese Weise erhielten, entsprach der erste einem löslichen Antigen-Antikörper Komplex bei Überschuss von Antigen, der zweite bestand aus reinem AFP. Das so isolierte AFP erwies sich als vollständig homogen und zeigte in der Immunelektrophorese nur eine einzige Präzipitationslinie. Lehmann und Mitarbeiter isolierten dagegen AFP in kristalliner Form aus dem Tumor und Plasma eines Patienten mit histologisch gesichertem Leberzellkarzinom. Die Isolation wurde in sieben Reinigungsschritten vollzogen: Hitzepräzipitation bei 50° C, Kalziumphosphatgelabsorption, fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zwischen 40 % und 70 % Sättigung, Anionenaustauscherchromatographie über DEAE-A-50-Sephadex, Gelfiltration über Sephadex G-100, Ammoniumsulfat bei einer Sättigung von ca. 60 % bei pH 7,35 in 0,2 m Sørensen-Puffer mit 1×10^{-3} m EDTA. Durch den letzten Schritt konnte eine Auskristallisierung von AFP als Mischkristall mit Albumin erzielt werden. Wegen der ähnlichen Molekülgrösse und elektrischen Ladung ist die Trennung dieser beiden Proteine mit den üblichen biochemischen Verfahren einschliesslich der quantitativen Elektrofokussierung nicht gelungen, so daß alle noch als Verunreinigungen enthaltenen Proteine anschliessend mit spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine präzipitiert wurden. Aus der verbliebenen Proteinlösung konnte AFP als Reinsubstanz auskristallisiert werden. Die Ausbeute dieses Verfahrens betrug 12,4 % bei einem Reinheitsgrad von 97 %. Eine Erhöhung des Reinheitsgrades auf 100 % ist nach Angaben der Autoren durch stufenweise Immunabsorption zu erzielen.

2.) Physikalisch-chemische Eigenschaften

Humanes alpha-1-Fetoprotein ist ein saures alpha-1-Glykoproteid, das in der Elektrophorese mit dem alpha-1-Globulin wandert und ein Molekulargewicht von 61.000 bis 75.000 hat (13, 141, 157, 158, 181). Die elektrophoretische Mobilität von humanem AFP wurde mit Hilfe der Immunelektrophorese in Agar-Gel zu $-6,08 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ bestimmt (141). Dieser Wert ändert sich nicht nach der Behandlung mit Neuramidase. In allen benutzten Trägern wandert AFP immer dicht hinter der Albuminfraktion. Obwohl AFP immunologisch und chemisch vom Albumin verschieden ist, wurde diese Ähnlichkeit zu Albumin in vieler Hinsicht beobachtet; z. B. Sedimentationskoeffizient, Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient, Löslichkeit in Ammoniumsulfatlösung und Verhalten bei der Ionenaustauscherchromatographie in Zellulose (3, 13, 158). Der Sedimentationskoeffizient von AFP liegt zwischen 4,5 und 5,5 S (87, 141, 157, 158) und der molare Extinktionskoeffizient beträgt $E_{1\text{ cm}}^{1\%} (278 \text{ m}, u) = 5,3$ (fetales AFP) bzw. 5,26 (Hepatom AFP) (87, 157, 158). Sein isoelektrischer Punkt liegt bei $\text{pH} = 5,08$ (141), das partielle spezifische Volumen beträgt $V_{20} = 0,726 \text{ ml/g}$ (157) und sein Diffusionskoeffizient $6,18 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ (157, 158).

Fetales AFP enthält 14,7 % Stickstoff, 1,7 % Schwefel und 3 % stickstofffreie Zucker (158). Diese Werte treffen auch im wesentlichen für AFP von Hepatom Patienten zu (87, 157). Folgende Aminosäuren (As) Zusammensetzung wurde für AFP gefunden:

(Die Werte entsprechen Mol/1000 Mol AS)

As	Hepatom	Fetus	As	Hepatom	Fetus
Asp	88	87	Met	10	8
Thr	63	65	Ile	46	44
Ser	64	66	Leu	96	94
Glu	186	197	Tyr	29	28
Pro	39	38	Phe	52	48
Gly	48	47	Lys	63	64
Ala	87	90	His	21	22
Cys	24	20	Arg	30	31
Val	51	48	Trp	3	3

Es zeigten sich hierbei zwischen dem AFP eines Hepatomträgers und dem fetalen AFP nahezu übereinstimmende Ergebnisse (157, 158). Alpert und Mitarbeiter fanden durch Isoelektrofokussierung, Ionenaustauscherchromatographie und Agarosegel-Elektrophorese verschiedene Formen von AFP. Die Behandlung mit Neuramidase bewirkte eine Umwandlung von zwei Hauptformen, die sich sowohl bei fetalem AFP als auch dem AFP aus dem Serum von Patienten mit einem Hepatom nachweisen ließen, zu einer homogenen Form mit langsamer elektrophoretischer Mobilität. Diese beiden Formen sind nicht durch Lagerung oder durch Isoelektrofokussierung bedingt, denn sie zeigten sich sowohl in frischem Serum als auch in Seren, die bei -80°C aufbewahrt wurden; ebenso zeigten sie sich bei der Ionenaustauscherchromatographie (13). Diese zwei molekularen AFP-Formen scheinen auch nicht vom pH abhängig zu sein, wie dies beim Albumin der Fall ist. Tumor-AFP soll bis zu vier Varianten und Subkomponenten haben, deren Unterschiede durch Behandlung mit Neuramidase und Entfernung der Sialinsäure weitgehend aufgehoben werden (174, 225).

Die Halbwertszeit von AFP liegt je nach Bestimmungsmethode und Patientengut, bei dem sie bestimmt wurde, zwischen 2 und 9 Tagen. Unmittelbar nach der Geburt ist bei dem Neugeborenen mit einer noch kürzeren Halbwertszeit zu rechnen. So beobachteten Karlsson und Mitarbeiter einen Abfall des AFP-Spiegels in den ersten zwanzig Stunden nach der Geburt von im Mittel 0,10 auf 0,02 mg/ml, während er vom zweiten bis vierten Tag an ziemlich konstant blieb, um dann kontinuierlich weiter abzufallen (97). Nørgaard-Pedersen errechnete für Neugeborene eine Halbwertszeit von 5 Tagen (163). Nach chirurgischer Entfernung eines malignen Teratoms der Ovarien bei einem 13-jährigen Mädchen bestimmten Mawas und Mitarbeiter die Halbwertszeit mit 9 Tagen (147). Bei postpartalen Frauen liegt die HWZ zwischen 2,5 und 9 Tagen, bei Patienten nach Teilhepatektomie bei Hepatom zwischen 5 und 8 Tagen und bei einem Patienten nach totaler Hepatektomie und Lebertransplantation bei 2 Tagen (85, 118, 153). Bei der Bestimmung mit radioaktiv-markiertem J^{131} betrug sie 6,2 Tage (85).

3.) Biochemische Eigenschaften und Physiologische Bedeutung des AFP

AFP wird physiologischerweise von fetalem Leber-, Dottersack- und Gastrointestinaltraktgewebe gebildet (4, 75, 76, 77).

Die Synthese findet an membran-gebundenen Polysomen statt (93, 113). Uriel und Mitarbeiter fanden AFP in den kleinen runden bis ovalen Übergangszellen der Hepatozyten, aber weder in normalen noch in maligne transformierten Leberzellen. Andere Arbeitsgruppen fanden AFP positive Zellen um Blutgefäße und Kapillaren bei Regeneration der Leber und in Hepatomen (2, 78, 161, 162, 221, 222).

Die Syntheserate für humanes AFP, bestimmt mit C^{14} markiertem Leucin an einer isoliert perfundierten fetalen Leber, beträgt 19 - 26 μ /min. (100).

AFP wird in der G_1 -Phase des Zellzyklus synthetisiert und in der G_2 -Phase eliminiert (193, 219). Untersuchungen von Desser-Wiest zeigten, daß AFP gemeinsam mit Corticosteron die Proliferation der Leberzellen reguliert (61). Corticosteron blockiert die Leberparenchymzellen in der G_1 -Phase; sinkt der Gehalt dieses Hormons im Serum, treten die Zellen synchron in die S-Phase. Nach Hepatektomie steigt nun die Konzentration von Corticosteron im Serum an und blockiert die Leberparenchymzellen in der G_1 -Phase, einige Zeit später wird das Hormon an AFP gebunden und so inaktiviert. Die Zellen, die bisher in G_1 blockiert waren, treten dann synchron in die S-Phase. Die physiologische Regulierung von AFP selbst wird durch alle jene Hormone beeinflusst, die das Wachstum oder die Reifung der Leberparenchymzellen kontrollieren (28). Die physiologische Bedeutung des AFP während der Fetalperiode scheint darin zu liegen, einen Teil der Funktionen des erst später gebildeten Albumins zu übernehmen (4). So nimmt man an, daß es der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks dient und auch den Feten gegenüber den mütterlichen Östrogenen schützt, was aufgrund einer im Tierexperiment nachgewiesenen starken Bindungskapazität des AFP für Östrogene als durchaus einleuchtend erscheint (166, 220, 222). Sein Einfluß auf das Immunsystem bedarf noch weiterer Abklärung (55, 56, 219).

4.) Nachweismethoden

Klinische Routinenachweismethoden, welche auch für die AFP-Bestimmung im Serum angewandt werden, sind entsprechend ihrer Empfindlichkeit in dem nachfolgenden Schema aufgeführt. Angegeben ist jeweils die untere Grenze

der Nachweisbarkeit in ng/ml.

Einfache radiale Immundiffusion (154)	5.000 - 50.000
Mikro-Duchterlony-Methode (10, 16, 122, 128)	10.000
Makro-Duchterlony-Methode (122)	5.200
Überwanderungselektrophorese (16, 122, 128)	3.600
Laurell-Immunelektrophorese (90, 163)	2.000
Latex-Agglutination (15), (128)	1.400 (500 - 250)
Fluoroelektroimmundiffusion (128)	500
Überwanderungsimmunelektrophorese (73)	1.000 - 500
Counter-Immun-Elektrophorese (10, 16, 128)	200 - 350
Elektroimmundiffusion mit Autoradiographie (10)	100 - 50
Indirekte Immunautoradiographie (2, 3, 65, 66)	50 (15 - 30)
Aggregathämagglutination (3)	50
Passive Hämagglutination (134, 159)	50 - 15
Enzymbindender Immunoassay (14), (29)	50 (1)
Radioimmunassay (51, 86, 90, 144, 160, 179, 184)	2,5 - 0,25

Qualitative Routinemethoden sind die Doppeldiffusion in der Mikromethode oder die Überwanderungselektrophorese. Zum quantitativen Nachweis ist der Radioimmunassay oder die passive Hämagglutination geeignet.

5.) Wertigkeit in der Schwangerschaft

AFP wird während der Schwangerschaft größtenteils in der fetalen Leber gebildet und gelangt über das Fruchtwasser auch in den mütterlichen Kreislauf. Bei normaler Schwangerschaft werden im mütterlichen Serum folgende

AFP-Konzentrationen gefunden: Im I. Trimenon bis 120 ng/ml, im II. Trimenon bis 360 ng/ml und im III. Trimenon bis ca. 550 ng/ml. Ein maximaler Wert wird zwischen der 35. - 38. Schwangerschaftswoche beobachtet. Die Fruchtwasserkonzentrationen zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf, jedoch erfolgt der Anstieg früher, und es werden höhere Werte erreicht. Gegen Ende der Schwangerschaft fallen die Spiegel wieder ab und betragen um die 42. Schwangerschaftswoche im Durchschnitt noch ca. 80 ng/ml; etwa drei Wochen post partum ist kein AFP im mütterlichen Serum mehr nachweisbar (53, 73, 122, 160, 183, 195, 198, 201).

Erhöhte und damit diagnostisch verwertbare Werte findet man allgemein bei Neuralrohrdefekten des Feten wie bei Meningomyelozen, Anenzephalie und Spina bifida. Besonders hohe Werte aber werden bei intrauterinem Fruchttod gefunden. Erhöhte AFP-Werte werden auch bei Mehrlingsschwangerschaften, Rhesusinkompatibilität und drohendem Abort gefunden (9, 40, 42, 73, 183, 195, 196, 200, 227). Differentialdiagnostische Bedeutung besitzt ein fehlender AFP Titer bei positivem human-chorionic-gonadotropine (HCG) Nachweis und vergrössertem Uterus. Diese Kombination weist auf das Vorliegen einer Blasenmole bzw. eines Chorionkarzinoms hin (195, 202). Eine noch bessere Korrelation des AFP zu fetalen Missbildungen ergibt sich bei Bestimmung des AFP im Fruchtwasser (73, 83, 195, 198).

6.) Wertigkeit bei malignen Tumoren

Bei Patienten mit primärem Leberzellkarzinom wurden in unterschiedlicher Häufigkeit erhöhte AFP-Spiegel im Serum (bis zu 10 mg/ml) gefunden. Das Ausmass des Nachweises erhöhter AFP-Werte hing wesentlich von der benutzten Messmethode ab. Erhöhte AFP-Werte wurden bei Anwendung der Mikro-Ouchter-

lony-Methode in 40 - 70 Prozent, bei der Elektroimmundiffusion und Latex-agglutination in 70 Prozent, bei der Überwanderungselektrophorese in 80 Prozent und bei der passiven Hämagglutination bzw. im Radioimmunassay in nahezu 100 Prozent gefunden (2, 53, 66, 102, 127, 128, 142, 143, 175, 176, 180, 185, 192, 207). Aber auch mit dieser Methode liessen sich nicht bei allen Patienten mit primärem Leberzellkarzinom AFP-Erhöhungen im Serum nachweisen (85). Zur Erklärung dieses Phänomens werden rassistische, ätiologische und z. T. histologische Unterschiede des Karzinoms diskutiert (63, 66, 103, 115, 142, 143, 180, 214). Jüngere Patienten scheinen häufiger einen erhöhten AFP-Spiegel zu haben (20, 44, 84, 138, 139, 147, 170). Einige Autoren fanden eine Korrelation zwischen dem Gehalt an AFP des Tumors und dem Grad der Entdifferenzierung im histologischen Schnitt (16, 142, 165). Dieser Zusammenhang konnte jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden (186). Ein Zusammenhang zwischen Tumorgröße, Tumorstadium und Stadium der Erkrankung und der Höhe des AFP-Spiegels im Serum scheint weder bei menschlichen noch bei tierischen Hepatomen zu bestehen (58, 120, 142, 189). Ein erhöhter AFP-Spiegel im Serum wurde ausserdem noch bei Teratomen und Teratoblastomen (3, 7, 138, 149, 195, 226) sowie bei endodermalen Sinustumoren (21, 91, 213, 217, 231) gefunden. Auch hier sind im Kindesalter AFP positive Tumoren häufiger anzutreffen (70 - 80 %) als bei Erwachsenen (15 - 20 %). Die wesentliche klinische Bedeutung von AFP-Bestimmungen wird heute weniger in der Früherfassung von Hepatomen und teratogenetischen Tumoren, als in der Kontrolle des Therapieerfolges gesehen. Hierbei ist ein vollständiges Verschwinden eines erhöhten AFP-Spiegels im Serum nach Tumoresektion, ein Wiederauftreten als Zeichen eines Rezidivs und ein fehlendes oder nur geringfügiges Absinken als Hinweis für eine nicht totale Tumoresektion oder eine schon bestehende Metastasierung diagnostisch verwertbar (13, 38, 65, 73, 109, 116).

7.) Wertigkeit bei nicht-malignen Erkrankungen

Unter den nicht-malignen Erkrankungen sind es vor allem die Erkrankungen des Leberparenchyms, die Ursache einer AFP-Erhöhung im Serum sein können. So finden sich in unterschiedlicher Häufigkeit und Höhe AFP-Anstiege im Serum bei akuter Hepatitis, bei chronisch aggressiver Hepatitis, chronisch persistierender Hepatitis, ferner bei drogeninduzierter und alkoholischer Hepatitis sowie bei Leberzirrhose unterschiedlicher Genese (2, 16, 73, 122, 132, 168, 171, 205). Ohlen und Richter fanden bei allen untersuchten Patienten mit akuter Virushepatitis AFP-Erhöhrungen zwischen 8 und 140 ng/ml. Die höchste Konzentration trat regelmässig 1 - 2 Wochen nach der initial stärksten Leberzellschädigung auf. Bei den chronisch persistierend gewordenen Krankheitsprozessen beobachteten sie bei keinem der Fälle ein endgültiges Absinken des AFP-Spiegels unter 10 ng/ml (168). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von AFP im Serum und dem Vorliegen einer Hepatitis B (HB_sAG u./od. Anti HB_s positiv), wie er von Smith (209) beschrieben wurde, konnten sie nicht bestätigen. Bei schwerer Hepatitis wird ein positiver AFP-Nachweis als Ausdruck einer intensiven Leberregeneration und sein Fehlen bei einer fulminanten Hepatitis als prognostisch schlechtes Zeichen gewertet. Werte über 2000 ng/ml wurden bei nicht-malignen Erkrankungen in aller Regel nicht mehr nachgewiesen, was Lehmann veranlasste, 2000 ng als obere Grenze eines zweiten Normalbereiches anzusehen (124). Die akute Virushepatitis führt in 0,3 % der Fälle zum Zeitpunkt des Transaminasengipfels oder in der Regenerationsphase, also ca. 14 Tage später, zu einem vorübergehenden Anstieg über diese Grenze (104, 185, 204).

In einer prospektiven Studie über AFP bei Leberzirrhose beobachteten Lehmann und Mitarbeiter bei ca. 22 % der Patienten pathologische Spiegel bis zu 2000 ng/ml unter Verwendung der passiven Haemagglutination und des Ra-

diolimmunassays. 84 - 95 % dieser Patienten zeigten im Verlauf einen transitorischen AFP-Anstieg und -Abfall, der als "Primärreaktion" einer Karzino-genese diskutiert wird (125, 133, 135, 170).

Besondere Verhältnisse liegen im Kindesalter vor, wo bei entzündlichen und toxischen Leberaffektionen eher mit einem höheren AFP-Anstieg zu rechnen ist (44, 139).



B.) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I.) DURCHFÜHRUNG DER AFP-BESTIMMUNGEN

1.) Material und Methoden

Die AFP-Bestimmungen wurden mit dem "RIA-Gnost"^R AFP-Radioimmunbesteck zur in vitro-Bestimmung von AFP" der Firma Behringwerke AG Marburg durchgeführt. Für Vergleichsuntersuchungen wurden der alpha-Fetoprotein-Riakit (Doppel-antikörpermethode) und der alpha-Fetoprotein Riakit II (PEG Methode) der Firma Abbott GmbH benutzt. Insgesamt wurden 13 Kits der Firma Behringwerke und 3 Kits der Firma Abbott verarbeitet.

Zur Ermittlung der alters- und geschlechtsbezogenen Normalwerte des AFP wurden bei 267 gesunden Kindern bis zum 15. Lebensjahr die AFP-Titer im Blut bestimmt (92 Jungen und 99 Mädchen im Alter von 2 - 15 Jahren sowie 86 Neugeborenen und Kindern bis zum 2. Lebensjahr).

Um die Wertigkeit einer AFP-Bestimmung bei verschiedenen Erkrankungen im Kindesalter sowie die Wirkungen bestimmter Medikamente auf die kindliche Leber im Hinblick auf eine AFP-Neosynthese zu untersuchen, wurden ferner die AFP-Spiegel von folgenden Patientengruppen bestimmt:

48 Kinder mit unterschiedlichen Lebererkrankungen

12 Kinder mit Mukoviszidose

89 Kinder, die mit Zytostatika therapiert wurden

7 Kinder unter hochdosierter Sexualhormontherapie

22 Kinder mit Spina bifida

10 Kinder mit Turner Syndrom

1 Kind mit Ataxia teleangiectatica

Die Gesamtzahl der analysierten Proben betrug 3558. Die Bestimmungen der Standards und Proben wurden als Doppel- und Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Kontrollen wurden als Drei- bzw. Fünffachbestimmungen durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle und labortechnischen Prüfung der Kits wurden 3 Kontrollseren mitgeführt. Der Einfluss sich ändernder Konzentrationen von radioaktiv markiertem Antigen (Ag^X), Antigen (Ag), Antikörper (Ak) und Polyäthylenglykol (PEG) auf das Analyseergebnis, als auch einer unterschiedlichen Messdauer der Proben, wurde anhand von 342 Proben untersucht. Eventuell mögliche Fehlbestimmungen durch eine Dysproteinämie und die dadurch bedingte unterschiedliche Ausfällbarkeit des Niederschlags von Albuminen und den verschiedenen Globulinen durch PEG wurde anhand von 232 Proben ermittelt. Weitere Versuche betrafen den Einfluss des wiederholten Einfrierens und Auftauens der Seren sowie unterschiedlicher Verdünnungen auf die AFP-Bestimmung.

2.) Beschreibung der Radioimmunassays

Mit dem Radioimmunassay der Firma Behringwerke sind Bestimmungen des AFP-Gehaltes in menschlichem Serum oder Fruchtwasser in einer Konzentration von 0 bis 480 ng AFP/ml Serum möglich. Die maximale Genauigkeit der Bestimmungsmethode liegt in dem Bereich zwischen 60 und 150 ng/ml. Seren mit einem höheren Gehalt an AFP müssen mit einer proteinhaltigen Verdünnungslösung soweit verdünnt werden, bis die in der Probe noch vorhandene AFP-Konzentration im Bereich dieser Messwerte liegt. Gegebenenfalls sind solche Seren in anderer Verdünnung im folgenden Kit erneut zu bestimmen. Bei Doppelbestimmungen lassen sich mit dem Inhalt des Testbestecks unter Verwendung von 6 Standards und eines Kontrollserums 42 Proben analysieren. Durch eine Abänderung des Kits, die weiter unten noch beschrieben wird,

sind bis zu 189 Doppelbestimmungen möglich.

Der Test basiert auf der konkurrierenden Bindung zwischen dem im Patientenserum vorhandenen nichtmarkierten und dem mit 125-J markierten AFP an dem AFP spezifischen Antikörper. Der Anteil des durch Antikörper gebundenen 125-J-AFP ist umgekehrt proportional zur Konzentration des in der zu bestimmenden Probe vorhandenen AFP. Der gebundene Anteil läßt sich mit PEG aus dem Reaktionsgemisch ausfällen und durch Abzentrifugieren und anschließendes Dekantieren des freien Überstandes von den freien Komponenten trennen. Die Bestimmung des 125-J-AFP im Präzipitat erfolgt dann mittels Messung der Radioaktivität in einem γ -Zähler.

Das Radioimmunassay-Testbesteck enthält folgende Reagenzien:

1. AFP (J-125) ca. 100 ng max. 4 μ Ci Lyophilisat aus 4 ml
2. 6 AFP Standards, Lyophilisate zu je 0,5 ml Proteinträgerlösung mit 0, 30, 60, 120, 240, 480 ng AFP/ml x)
3. Anti-AFP-Serum vom Kaninchen, Lyophilisat aus 4 ml
4. Testserum, Lyophilisat aus 0,5 ml Serum mit definiertem AFP Gehalt
5. Verdünnungsserum, Lyophilisat aus 4 ml Pferdeserum
6. 55 ml gebrauchsfertige Polyäthylenglykol-Lösung (PEG)

Die gefriergetrockneten Reagenzien des Testbestecks werden in sterilem destillierten Wasser gemäß nachfolgendem Schema aufgelöst.

x) Die zunächst von der Firma Behringwerke angegebenen Konzentrationen der Standards wurden im Laufe der Untersuchungen korrigiert, so daß der zu 30 ng angegebene Wert 34 ng AFP/ml entsprach, entsprechend 60 = 68, 120 = 136, 240 = 272, 480 = 544. Falls im folgenden absolute AFP-Konzentrationen berechnet wurden, wurde dieses entsprechend berücksichtigt; bei der Darstellung relativer Beziehungen bleibt diese Änderung jedoch ohne Einfluss auf das Ergebnis.

<u>Reagenz</u>	<u>Zugabe von aqua dest.</u>
125-J-AFP	20 ml
Anti-AFP-Serum	20 ml
je AFP Standard	0,5 ml
Testserum	0,5 ml
Verdünnungsserum	15 ml
Polyäthylenglykol	gebrauchsfertig

Für die Analysenansätze wurden Teströhrchen aus Polystyrol (3 ml Volumen) benutzt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden folgendermassen durchgeführt:

1. Pipettieren von je 0,1 ml Serum bzw. Standard AFP Protein in die Teströhrchen.
2. Hinzufügen von je 0,2 ml 125-J-AFP und Durchmischen am Rotator.
3. Hinzufügen von je 0,2 ml Anti-AFP-Serumlösung und Durchmischen am Rotator.
4. Inkubation der Testansätze für ca. 3 Std. ($2\frac{1}{2}$ - 5) bei Raumtemperatur. Die 1 : 4 verdünnten Kits wurden 16 ± 4 Std. inkubiert.
5. Zufügen von 0,5 ml 0° - 4° kalter PEG-Lösung. Anschließend gutes Durchmischen der Testansätze am Rotator bis eine homogene Suspension entsteht.
6. Die Röhrchen wurden 15 - 20 Min. in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (ca. 4000 Upm, $g > 1000$).
7. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Reaktionsgefässe noch ca. 5 - 10 Min. zum Abfließen etwa noch vorhandener Flüssigkeitsreste mit ihrer Öffnung auf eine Zellstoff-

unterlage gestellt.

8. Die Radioaktivität des Präzipitates wurde im 125-J Kanal eines γ -Probenwechslers gemessen. Die Messzeit betrug in der Regel 5 Min. entsprechend minimal 10^4 Impulsen pro Minute (Ipm) pro Standard 0 (S_0) Probe.

Die Tabelle 1 gibt einen schematischen Überblick über die durchzuführenden Arbeitsschritte in den Testansätzen entsprechend der Gebrauchsanweisung des Kits.

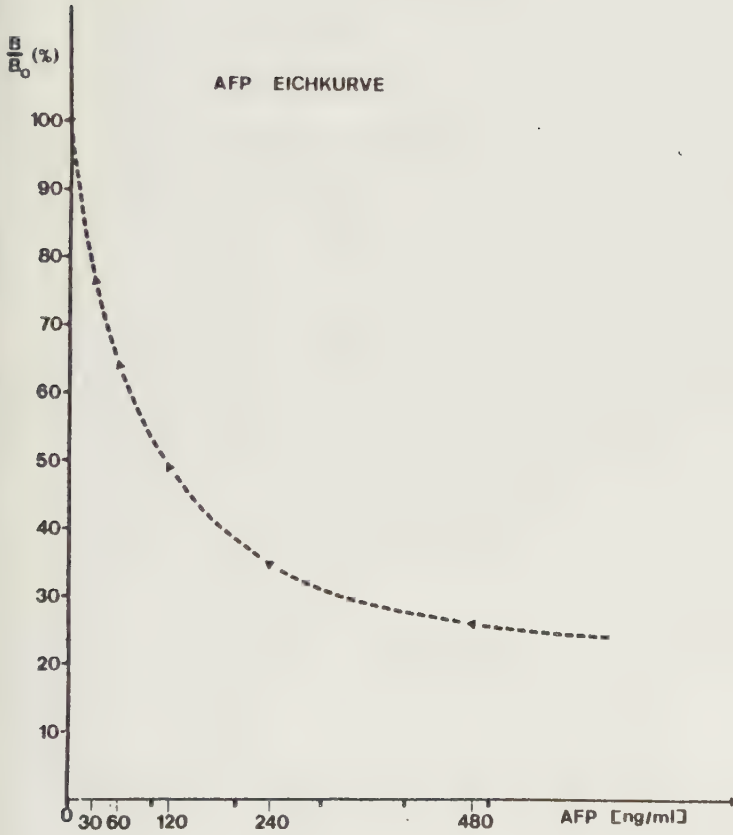
Die Umrechnung von Impulsen pro Minute (Ipm) in absolute Konzentrationen an AFP geschieht mit Hilfe einer Eichkurve, die mittels der Standardwerte konstruiert wird. Hierzu berechnet man die prozentuale Bindung von 125-J-AFP je Standard aus der Impulsrate. Der Mittelwert der gemessenen Impulse (Ipm) für die Standards, bezogen auf den Mittelwert der Impulse, die für den Standard 0 (S_0) gemessen wurden, gibt die relative Bindung an (Die Ipm von S_0 werden gleich 100 % gesetzt). Die Werte der relativen Bindung ($B_x/B_0 \times 100$) sind durch dieses Verfahren normiert und von der absoluten Radioaktivität unabhängig. Dann zeichnet man den Mittelwert der relativen Bindung für jeden Standard als Ordinate gegen die AFP-Konzentration (ng/ml), die linear auf der Abzisse eingetragen wird. Verbindet man die so erhaltenen Punkte miteinander, so erhält man eine Hyperbel. Mit Hilfe dieser Kurve kann man die AFP-Konzentrationen in den zu untersuchenden Proben bestimmen. Hierzu errechnet man in gleicher Weise den Mittelwert der relativen Bindung für die Serumprobe und kann die zu diesem Wert gehörende Konzentration an AFP auf der Abzisse ablesen (Abb. 1). Auf die Möglichkeiten der halblogarithmischen Darstellung bzw. auf Linearisation der Standardkurven mittels logit-log Kurvenblättern wird später eingegangen.

Zentrifugieren, Dekantieren und Messen

Tab. 1 Durchführung des Radiolimmunoassay zur AFP-Bestimmung

Nr. des Test- röhrchens.	Bezeichnung der Probe	AFP Standard (ml)	Testserum/ probe (ml)	125-J-AFP (ml)	Anti-AFP (ml)	PEG (ml)
Inkubation für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur						
1	Standard S ₀	0 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
2		0,1	-	0,2	0,2	0,5
3	Standard S ₁	30 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
4		0,1	-	0,2	0,2	0,5
5	Standard S ₂	60 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
6		0,1	-	0,2	0,2	0,5
7	Standard S ₃	120 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
8		0,1	-	0,2	0,2	0,5
9	Standard S ₄	240 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
10		0,1	-	0,2	0,2	0,5
11	Standard S ₅	480 ng/ml	-	0,2	0,2	0,5
12		0,1	-	0,2	0,2	0,5
13	Testserum H	-	0,1	0,2	0,2	0,5
14		-	0,1	0,2	0,2	0,5
15		-	0,1	0,2	0,2	0,5
16	Kontrolle P ₁	-	0,1	0,2	0,2	0,5
17		-	0,1	0,2	0,2	0,5
18		-	0,1	0,2	0,2	0,5
19	Kontrolle P ₂	-	0,1	0,2	0,2	0,5
20		-	0,1	0,2	0,2	0,5
21		-	0,1	0,2	0,2	0,5
22	Probe 1	-	0,1	0,2	0,2	0,5
23		-	0,1	0,2	0,2	0,5
96	unspez. Bindung	-	0,1	0,2	-	0,5
97		-	0,1	0,2	-	0,5
98	Totale	-	-	0,2	-	-
99		-	-	0,2	-	-
100		-	-	0,2	-	-

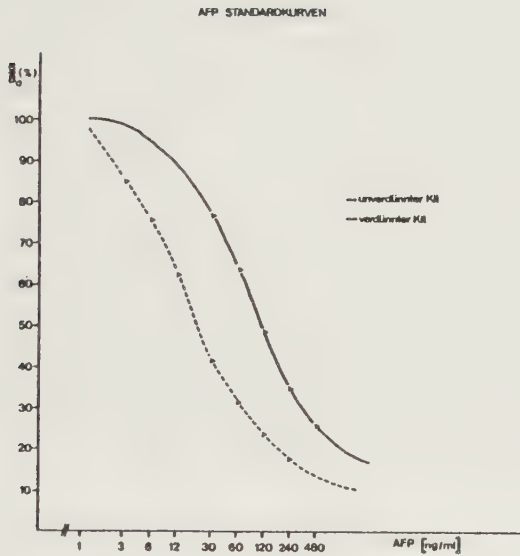
Abb. 1



Eichkurve zur Ermittlung der AFP-Konzentrationen

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten AFP-Konzentrationen wurden alle direkt mittels eines programmierbaren Tischrechners (Tektronix TEK 31), der an den γ -Counter angeschlossen war, errechnet. Zur Bestimmung von niedrigen AFP-Werten, wie z. B. den Normalwerten, die alle unterhalb der Konzentration des niedrigsten Standardserums von 30 ng AFP/ml lagen, wurde der Kit abgeändert. Hierzu wurde die 125-J-AFP sowie die Anti-AFP-Lösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1 : 4 verdünnt, die Inkubationszeit auf 16 ± 4 Stunden verlängert und zur Erstellung der Eichkurve weitere Standards zu 3, 6 und 12 ng AFP/ml eingeführt. Der Standard zu 480 ng/ml entfiel. Durch diese Änderungen wurde die in halblogarithmischer Darstellung normalerweise umgekehrt S-förmige Standardkurve im Bereich bis zu 10 ng/ml fast linear, womit eine differenziertere Zuordnung der Impulsrate pro Minute/Konzentration gegeben war und eine exaktere Bestimmung in diesem Bereich möglich wurde (Abb. 2). Eine grössere Genauigkeit wurde dadurch in zweifacher Hinsicht erzielt. Erstens könnten Werte unterhalb 30 ng mit der üblichen Methode nur durch Extrapolation bestimmt werden, andererseits war durch die erzielte steilere und fast lineare Kurve mathematisch eine bessere Zuordnung gegeben.

Abb. 2



Standardkurven des AFP RIA für die herkömmliche Methode (unverdünnter Kit)
und die empfindlichere Methode (verdünnter Kit)

Für Vergleichsuntersuchungen wurde der α -Fetoprotein-Riakit (Doppelantikörpermethode ^{x)}) und der α -Feto-Riakit II (PEG Methode) der Firma Abbott GmbH benutzt.

Bei der Doppelantikörpermethode inkubiert man die unbekannte Serumprobe bzw. die Standards und Kontrollseren, das 125-J-AFP und den ersten Antikörper (Anti-AFP-Serum vom Kaninchen) in einem Testansatz. Nach dieser Inkubationsperiode wird dem Reaktionsgemisch ein zweiter Antikörper (Anti-Kaninchen- γ -Globulin von der Ziege) zugesetzt, so daß sich ein unlösbarer Immunkomplex bildet. Das so entstandene Immunpräzipitat wird von dem ungebundenen, freien Antigen durch Zentrifugation abgetrennt. Durch Messen der Radioaktivität des Testansatzes vor und nach Abtrennung des Immunpräzipitates, kann man das Verhältnis von gebundener zu freier Aktivität ermitteln. Dieses Verhältnis steht innerhalb bestimmter Grenzen in direkter Relation zu der Menge des AFP in den unbekannten Serumproben bzw. den bekannten Standards. Bei Verwendung einer Standard-Eichkurve kann von dem prozentualen Anteil der Aktivität des Immunpräzipitates direkt auf die AFP-Konzentration in der unbekannten Serumprobe geschlossen werden.

Der Doppelantikörperkit ermöglicht die Bestimmung von 50 Testansätzen. Dies entspricht bei der Durchführung von Doppelbestimmungen 17 unbekannten Serumproben. Er besteht aus den folgenden Reagenzien:

- x) Dieser Kit wurde inzwischen aus dem Handel gezogen und durch Riakit II PEG ersetzt.

1. 5,5 ml 125-J-AFP Reagenzlösung, pH 8,6, Gesamtaktivität kleiner als 0,5 μ Ci
2. 5,5 ml erster Antikörper: Anti-AFP-Serum vom Kaninchen
3. 5,5 ml zweiter Antikörper: Anti-Kaninchen- γ -Globulin von der Ziege
4. 2,0 ml AFP-Standard 320 ng/ml
5. 10 ml Pufferlösung: 0,5 m Boratpuffer, pH 8,6, mit 2,5 % Rinderalbumin
6. 2,5 ml Pferdeserum

Die 125-J-AFP Lösung sowie der erste und zweite Antikörper liegen gebrauchsfertig vor. Das Boratpuffer-Konzentrat muß im Verhältnis 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnt werden, so daß ein 0,5 m Boratpuffer mit pH 8,6 und einem Rinderalbumingehalt von 0,5 % entsteht.

Die einzelnen Standards werden gemäß folgendem Schema hergestellt:

Standardlösung Nr.	Pufferlösung (ml)	AFP-Standard (ml)	Konzentration (ng/ml)
1	-	unverdünnt	320
2	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 1	160
3	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 2	80
4	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 3	40
5	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 4	20
6	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 5	10
7	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 6	5
8	1,0	+ 1,0 Lösung Nr 7	0

Die Durchführung der Bestimmungen geschieht folgendermassen:

1. Pipettieren von 0,5 ml Boratpufferlösung in die Teströhrchen für die Bestimmung der unbekannten Serumproben.

In die Teströhrchen zur Analyse der Standardlösungen werden nur 0,4 ml Puffer und zusätzlich 0,1 ml Pferdeserum pipettiert.

2. Zufügen von 0,1 ml der zu bestimmenden Serumprobe bzw. der einzelnen Standardwerte.

Anschliessend wird der Inhalt gründlich gemischt.

3. Pipettieren von 0,1 ml 125-J-AFP.

Erneutes gründliches Mischen.

4. Pipettieren von 0,1 ml des ersten Antikörpers, gründlich mischen und Testansätze mit Parafilm verschließen.

5. Inkubation für die Dauer von 24 - 48 Stunden bei $4 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

6. Pipettieren von 0,1 ml des zweiten Antikörpers, gründlich mischen und Teströhrchen mit Parafilm verschließen.

7. Inkubation für 24 Stunden bei $4 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

8. Messen der Gesamtaktivität jedes Ansatzes im 125-J-Kanal eines γ -Counter.

9. Zentrifugieren des Reaktionsgemisches bei 3000 Upm für die Dauer von 30 Minuten.

10. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Abtropfen eventueller Restflüssigkeit auf einer Zellstoffunterlage.

11. Messung der Aktivität des Immunpräzipitates.

Die einzelnen durchzuführenden Arbeitsschritte sind in Tabelle 2 nochmals schematisch dargestellt.

Der prozentuale Anteil des antikörpergebundenen 125-J-AFP an der Gesamaktivität kann nach folgender Formel errechnet werden:

$$\text{prozentuale Bindung (125-J-AFP)} = \frac{\text{Aktivität des Immunpräzipitates (Ipm)} \times 100}{\text{Gesamaktivität des Reaktionsgemisches (Ipm)}}$$

Die relative Bindung errechnet sich nach der Formel:

$$\text{prozentuale rel. Bindung (125-J-AFP)} = \frac{S_x (Ipm) \times 100}{S_n}$$

Die Erstellung einer Standard-Eichkurve und die Bestimmung der AFP-Werte unbekannter Serumproben anhand dieser Kurve erfolgt in der gleichen Weise, wie dies für den vorherigen Kit bereits beschrieben wurde.

Messen der Aktivität des Immunpräzipitates
 Dekantieren, Abtropfenlassen
 Zentrifugieren 3000 Upm 30 min.
 Messen der Gesamtaktivität
 Inkubation 24 Std. bei 4 - 20° C

Tab. 2 Durchführung des Radioimmunoassay zur AFP-Bestimmung (Doppelantikörpermethode, Fa. Abbott)

Nr. des Test- röhrchens	Bezeichnung der Probe	Borat- puffer (ml)	Pferde- serum (ml)	Standard- lösung (ml)	Test- probe (ml)	125-J- AFP (ml)	1. Ak (ml)	2. Ak (ml)
1	Standard 8	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
2								
3	Standard 7	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
4								
5	Standard 6	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
6								
7	Standard 5	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
8								
9	Standard 4	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
10								
11	Standard 3	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
12								
13	Standard 2	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
14								
15	Standard 1	0,4	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1
16								
17	Testprobe	0,5	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
18								
19	Testprobe	0,5	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
20								
21	Unspez. B.	0,5	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								

Inkubation 24 - 48 std. bei 4 - 20° C

Der Riakit II ist ebenfalls für die Bestimmung von 50 Ansätzen einschliesslich von 6 Standards, entsprechend 19 Proben bei Doppelbestimmungen, ausgelegt. Er enthält folgende Reagenzien:

1. 5,5 ml 125-J-AFP (125-J markierte AFP-Lösung) mit einer Aktivität von weniger als 0,09 μ Ci/ml, was einer spezifischen Aktivität von ungefähr 10 bis 33 μ Ci/g entspricht.
2. 5,5 ml AFP-Antikörper (Anti-AFP Ziegenserum).
3. 6 AFP-Standards 0,5 ml zu je 0, 10, 30, 80, 160, 320 ng/ml.
4. 60 ml 21 % Polyäthylenglykollösung.

Die Durchführung entspricht im wesentlichen derjenigen des vorne beschriebenen PEG-Kits.

1. Pipettieren von 0,1 ml Standard bzw. zu bestimmenden Serum.
2. Hinzufügen von 0,1 ml 125-J-AFP, gutes Durchschütteln.
3. Zufügen von 0,1 ml der AFP-Antikörper-Lösung, mischen, Verschluss der Testansätze mit Parafilm.
4. Inkubation für 3 Stunden bei Raumtemperatur ($25^{\circ} \pm 10^{\circ}$ C).
5. Messen der Totalaktivität in einigen der Testansätze während der Inkubationszeit.
6. Hinzufügen von 1,0 ml Polyäthylenglykollösung, gutes Durchmischen für 5 - 10 sec.
7. 20 Minuten zentrifugieren der Teströhrchen bei Raumtemperatur mit 3000 Upm (2200 x g).

8. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes. Zum Abtropfen der letzten Flüssigkeitsreste werden die Teströhrchen noch für 5 bis 10 Minuten mit ihrer Öffnung auf eine Zellstoffunterlage gestellt.

9. Messen der Aktivität im Präzipitat mit einem γ -Counter.

Die Auswertung anhand der Eichkurve geschieht analog zu der bei den vorherigen Kits beschriebenen Methode. Eine Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte wird anhand von Tabelle 3 gegeben.

3.) Beschreibung der Messapparatur

Die Aktivität der Proben wurde im γ -Kanal (125-J) eines Probenwechslers XL 8265 Gammaset 500 ICN gemessen. Die Bestimmung der AFP-Konzentrationen erfolgte durch einen Tektronix TEK 31 Tischrechner, der dem Probenwechsler direkt angeschlossen war. Den Berechnungen lag ein Programm zugrunde, gemäss dem durch die vorgegebenen Standardpunkte approximativ eine Kurve 3-ten Grades als Regressionsfunktion gelegt wurde. Mittels Standardwerten und dieser Kurve wurden die gemessenen Impulsraten (counts per minute) in relative prozentuale Bindung und diese dann in die definitiven AFP-Konzentrationen umgerechnet.

Methodisch lag diesem Vorgehen das gleiche Prinzip zugrunde, wie vorne bei der Handauswertung anhand der Standard-Eichkurve beschrieben. Eine Handauswertung und graphische Darstellung wurden im übrigen nur zur näheren Verdeutlichung spezieller Probleme, wie z.B. der Beeinflussbarkeit der Bindung herangezogen.

Tab. 3 Durchführung des Radioimmunoassay zur AFP-Bestimmung (PEG Methode, Fa. Abbott)

Teströhrchen Nr.	Probenbezeichnung	Standard- lösung (ml)	Test- probe (ml)	125-I-AFP (ml)	Anti-AFP (ml)	PEG (ml)
1	Standard 0 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
2						
3	Standard 10 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
4						
5	Standard 30 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
6						
7	Standard 80 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
8						
9	Standard 160 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
10						
11	Standard 320 ng/ml	0,1	-	0,1	0,1	1,0
12						
13	Testprobe	-	0,1	0,1	0,1	1,0
14						
15	Testprobe	-	0,1	0,1	0,1	1,0
16						
...						
49	unspez. Bindung		0,1	0,1	-	1,0
50						

Zentrifugieren, Dekantieren, Messen der Aktivität
des Immunpräzipitates

Inkubation 3 std. 25 ± 10^0 C
Messen der Totalaktivität in einigen Teströhrchen

4.) Probenentnahme und Aufbewahrung

Zur Bestimmung der AFP-Konzentrationen im Serum wurden den Patienten ca. 5 ml Blut venös entnommen. Dieses wurde anschliessend abzentrifugiert und das Serum in 2 Portionen zu je etwa 1 ml in einer Tiefkühltruhe bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Zur Analyse wurden diese Seren nach dem Auftauen unverdünnt in der für die einzelnen Kits vorgesehenen Menge in die Teströhrchen pipettiert. Diejenigen Seren, die eine AFP-Konzentration über 480 ng/ml bzw. 320 ng/ml erwarten liessen, wurden von vornherein in einem verdünnten Ansatz mitgeführt. Wurde von einem Serum eine erneute Bestimmung in grösserer Verdünnung notwendig, weil sich die in der Probe befindliche AFP-Menge nicht mit dem optimalen Analysenbereich der Eichkurve deckte, so wurde für die Zweitbestimmung die bisher noch nicht aufgetaute Serumportion verwandt, obwohl sich bei Kontrolluntersuchungen durch mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren der Patientenserum keine Verfälschung der Ergebnisse nachweisen liess.

II.) LABORTECHNISCHE UNTERSUCHUNGEN

1.) Grundgrößen des Radio-Immunassay

Neben der Zusammenstellung von klinischen Einsatzmöglichkeiten, d. h. der Erfassung von Patientenkollektiven, bei welchen eine AFP-Bestimmung als Screeningmethode oder Verlaufskontrolle bei den vorliegenden Erkrankungen indiziert wäre, wurde der AFP RIA auch auf seine labortechnische Handhabbarkeit und Durchführbarkeit und die dabei auftretenden Fehlermöglichkeiten geprüft.

In Tabelle 4 sind die wichtigsten Messgrößen der durchgeführten Kits zusammengestellt. Die senkrechten Spalten enthalten die Ergebnisse der einzelnen Kits. Waagerecht sind die sich entsprechenden Messgrößen ablesbar:

- Kurvenbereich, der zur Analyse verwertbar ist, ausgedrückt in % der rel. Bindung.
- Korrelation zwischen den gemessenen tatsächlichen Koordinatenwerten der Standardpunkte und den unter Zugrundelegen einer Idealkurve rechnerisch bestimmten.
- Standardfehler bei Zugrundelegung der ermittelten Idealkurve.
- Mittelwert der Totalaktivität (At) pro Teströhrchen.
- Unspezifische Bindung ausgedrückt in % rel. Bindungsrate.
- Unspezifische Bindung ausgedrückt in % der Totalaktivität.
- Background, Mittelwert in Ipm.
- Pro einzelнем Standard gemessene Impulsrate und die entsprechende rel. Bindung in %.
- Die jedem Standardwert entsprechende absolute Bindung in %.

Die geringste gemessene Konzentration lag in den einzelnen Kits zwischen 0,1 und 1 ng/ml. Die Empfindlichkeit des Kits bei 10^4 ausgezählten Impulsen, entsprechend einer 97 % Grenze für $B_0 - 3s_{B_0}$, liegt bei 0,5 (1,3) ng AFP/ml. Die höheren Werte bei diesen Angaben gelten hierbei jeweils für die unverdünnten Kits.

Die Abbildung 3 zeigt die wirkliche Bindung der Standardwerte aller Kits, wobei eine Bindungskurve exemplarisch eingezeichnet wurde. Die Ordinatenachse ist bei dieser Darstellung nach dem Gauss'schen Integral unterteilt, die Abzissenachse ist dagegen gleichmässig geteilt. Im Einzelfall lässt sich durch diese Art der Darstellung näherungsweise eine Linearisation der Standardkurve und damit eine ganz exakte Zuordnung der Messwerte erreichen. Unter Berücksichtigung mehrerer Bindungskurven zeigt sich jedoch auch bei dieser Darstellungsart stets der Trend in Richtung auf eine umgekehrt S-förmige Kurve. Deutlich zu erkennen ist, daß die Bindungsrate in den Kits der Firma Abbott wesentlich höher liegt.

Die Abbildung 4 zeigt den Einfluss der unspezifischen Bindung und der Untergrundzählrate des Geräts (background) auf den Verlauf einer linearisierten Standardkurve anhand der Standardkurve eines verdünnten Kits. Hierbei wurden die Impulsraten für die unspezifische Bindung allein bzw. für unspezifische Bindung und Untergrundzählrate von der rel. % Bindung subtrahiert und eine korrigierte Standardkurve gemäss folgender Formel errechnet:

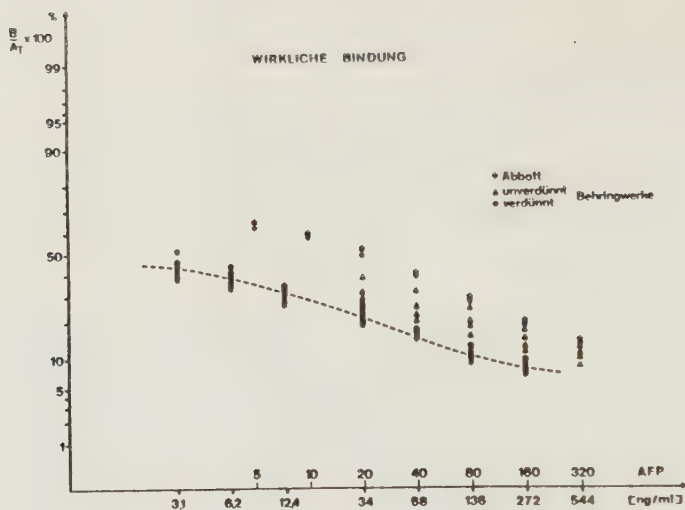


Abb. 3 Tatsächliche Bindung der Standardseren

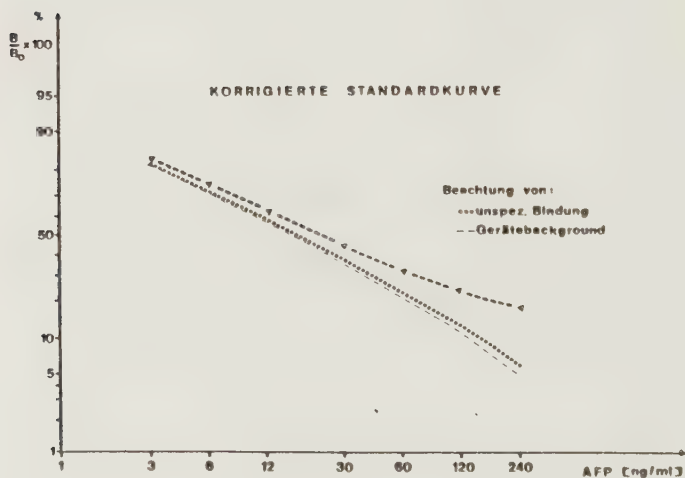


Abb. 4 Korrigierte Standardkurve unter Berücksichtigung der unspez. Bindung und des Gerätebackground

$$\text{rel. B (\%)} = \frac{B - B_{\text{unspez.}}}{B_0 - B_{\text{unspez.}}} \times 100$$

bzw.

$$\text{rel. B (\%)} = \frac{B - (B_{\text{unspez.}} + \text{Background})}{B_0 - (B_{\text{unspez.}} + \text{Background})} \times 100$$

Wie die Abbildung 4 zeigt, kann die Berücksichtigung beider Werte in dem für die Serum-AFP-Bestimmungen benutzten Analysenbereich der Kurve (bis ca. 60 ng) vernachlässigt werden. Erst bei niedrigeren Impulsraten, entsprechend höheren AFP-Konzentrationen, fällt diese unspezifisch in den Teströhrchen haften bleibende Aktivität bzw. Basisimpulsrate der Umgebung prozentual höher ins Gewicht. Insbesondere ist eine Vernachlässigung dieses Parameter gerechtfertigt, wenn man davon ausgeht, daß die unspez. Bindung für Standards und Serumproben annähernd gleich ist, und sich damit ein Fehler in der AFP-Bestimmung bei Verwendung unkorrigierter Standardkurven eliminiert. Die in den Testproben hierbei gemessenen etwas höheren Impulsraten werden lediglich in absolute AFP-Konzentrationen umgerechnet gemäss einer Standardkurve, die insgesamt einen höheren Impulsratewert/Standard aufweist, als der tatsächlichen Bindung entsprechen würde. Eine zu berücksichtigende Verfälschung der absoluten AFP-Konzentrationen in den Proben wird hierdurch nicht hervorgerufen.

Die Tabelle 5 zeigt die Änderung der Impulsrate und der rel. Bindungsrate am Beispiel der Standardwerte dreier Kits. Die erste waagerechte Spalte zeigt jeweils die Impulsrate pro Minute für die angegebenen Grössen, die zweite Spalte die gemäss obiger Formel korrigierte Impulsrate für den

	IPM		BACKGROUND	UNSPEC. B.	BEIDE	
TOTAL	3598		13	211	224	
STANDARD 0	1563		1550	1352	1339	
STANDARD 3	1410	90,2	90,1	88,7	88,6	
STANDARD 6	1264	80,9	80,7	77,9	77,7	
STANDARD 12	1052	67,3	67,0	62,2	61,8	
STANDARD 30	669	42,8	42,3	33,9	33,2	
STANDARD 60	511	32,7	32,1	22,2	21,4	
STANDARD 120	388	24,8	24,2	13,1	12,2	
STANDARD 240	263	16,8	16,1	3,8	1,4	
TOTAL	4627		17	236	253	
STANDARD 0	2327		2310	2091	2074	
STANDARD 3	1754	75,4	75,2	72,6	72,4	
STANDARD 6	1520	65,3	65,1	61,4	61,1	
STANDARD 12	1200	51,6	51,2	46,1	45,7	
STANDARD 30	928	39,9	39,4	33,1	32,5	
STANDARD 60	685	29,4	28,9	21,5	20,8	
STANDARD 120	454	19,5	18,7	10,4	10,0	
STANDARD 240	313	13,5	12,8	3,7	2,9	
TOTAL	3743		16	246	262	
STANDARD 0	2018		2002	1772	1756	
STANDARD 3	1690	83,7	83,6	81,5	81,3	
STANDARD 6	1508	74,7	74,5	71,2	71,0	
STANDARD 12	1259	62,4	62,1	57,2	56,8	
STANDARD 30	889	44	43,6	36,3	35,7	
STANDARD 60	647	32	31,5	22,6	21,9	
STANDARD 120	465	23	22,4	12,4	11,6	
STANDARD 240	349	17,5	16,6	5,8	4,9	

Standard 0. In den folgenden Spalten ist die entsprechend korrigierte Bindungsrate in Prozent für jeden Standard eingetragen.

2.) Intraassayvarianz und Interassayvarianz

Zur Qualitätskontrolle wurden in jedem Kit 3 Kontrollproben mitgeführt. Die beiden ersten wurden durch Mischen von jeweils ca. 6 ml Serum von 8 schwangeren Frauen hergestellt. Bei dem dritten Kontrollserum handelte es sich um ein lyophilisiertes handelsübliches AFP-Konzentrat von definierter Konzentration. In den verdünnten Kits wurden alle Kontrollen in einer 1 : 10 Verdünnung eingesetzt, in den unverdünnten Kits unverdünnt. Die Analysen der Kontrollen erfolgten als 5-fach Bestimmungen in den verdünnten, als 3-fach Bestimmungen in den unverdünnten Kits.

Die Intraassayvariationskoeffizienten lagen zwischen 1,4 % und 12 % für die verdünnten und 0,9 % bis 7,7 % für die unverdünnten Kits. Die Abbildung 5 zeigt die Mittelwerte, die Standardabweichung und die Interassayvariationskoeffizienten des Poolserum 2, des Poolserum 1 und des Kontrollserum 3 für die durchgeführten verdünnten Kits.

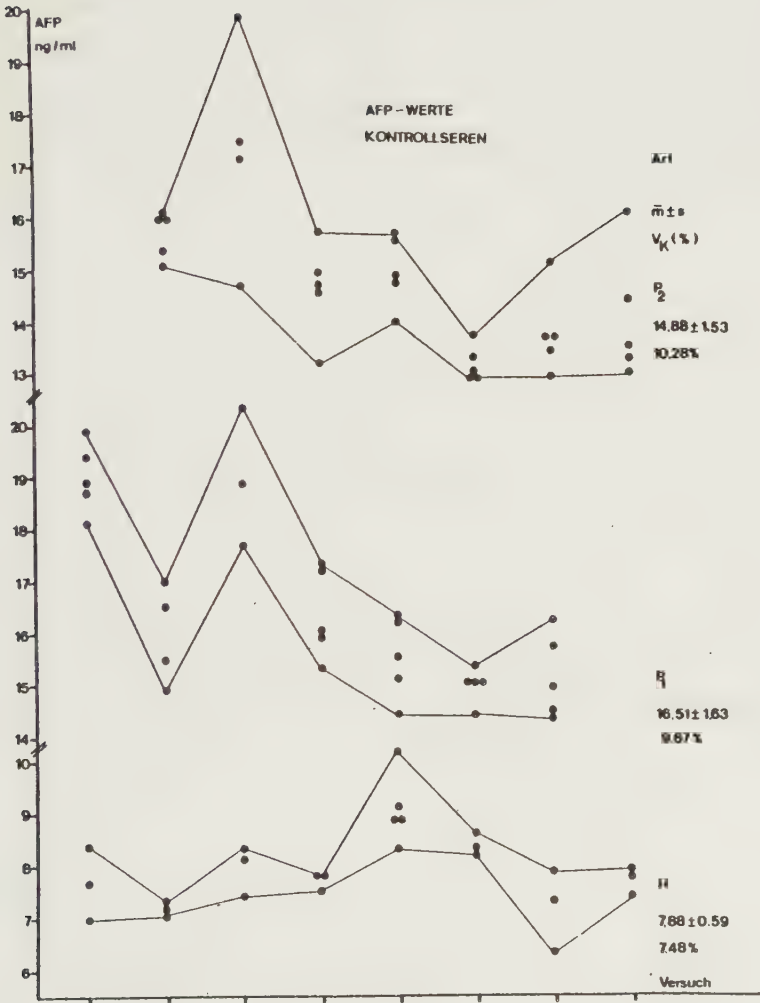


Abb. 5 Ergebnis der Qualitätskontrolle

3.) Recovery-Test

Der "recovery-Test" gibt Aufschluss darüber, ob sowohl das Standard AFP als auch das endogene AFP in gleicher Weise mit dem AFP spezifischen Antikörper reagieren. Der Test wurde durchgeführt, indem zu den AFP-Standarden mit bekannter Konzentration jeweils drei Seren mit unterschiedlicher AFP-Konzentration hinzugefügt wurden. Der AFP-Gehalt dieser Seren wurde vorher bestimmt:

Serum 1 : s_1 = 0 ng AFP/ml

Serum 2 : s_2 = 2,5 ng AFP/ml

Serum 3 : s_3 = 50 ng AFP/ml

Die auf diese Weise hergestellten Testseren s_1 , s_2 und s_3 lagen mit ihrer AFP-Menge jeweils um den AFP-Gehalt von s_1 , s_2 und s_3 über den einzelnen Standardkonzentrationen.

In der Tabelle 6 sind die gefundenen Analysenwerte zusammengestellt. Die Abbildung 6 zeigt eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse mit den dazugehörigen Regressionsgraden und Korrelationskoeffizienten.

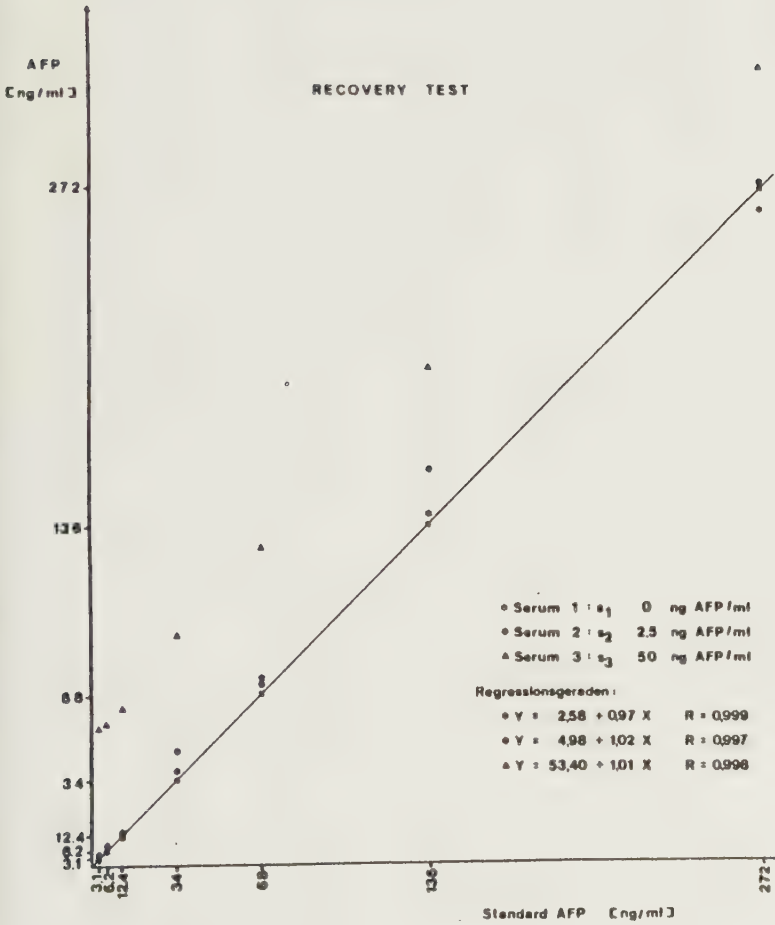


Abb. 6 Auswertung des "Recovery-Tests"

Tabelle 6 Werte des "Recovery-Tests"

	s _{Nr}	Stand. AFP (ng/ml)	erwartet AFP (ng/ml)	gefunden AFP (ng/ml)	recovery rate AFP (%)
Serum S ₁	s ₁ +	3,1	3,1	3,4	110
	s ₁ +	6,2	6,2	5,6	90
	s ₁ +	12,4	12,4	13,0	105
	s ₁ +	34	34	38,2	112
	s ₁ +	68	68	74,7	110
	s ₁ +	136	136	140,9	104
	s ₁ +	272	272	262,8	97
Serum S ₂	s ₂ +	3,1	5,6	5,2	93
	s ₂ +	6,2	8,7	7,9	91
	s ₂ +	12,4	14,9	13,2	89
	s ₂ +	34	36,5	46,3	127
	s ₂ +	68	70,5	72,8	103
	s ₂ +	136	138,5	159,7	115
	s ₂ +	272	274,5	275,3	100
Serum S ₃	s ₃ +	3,1	53,1	55,4	104
	s ₃ +	6,2	56,2	56,6	101
	s ₃ +	12,4	62,4	62,7	100
	s ₃ +	34	84	91,8	109
	s ₃ +	68	118	127,8	108
	s ₃ +	136	186	199,5	107
	s ₃ +	272	322	320,8	100

Wie anhand der Tabelle 6 und der Abbildung 6 verdeutlicht wird, zeigen die in diesem Test gefundenen Werte eine sehr gute Übereinstimmung mit den zu erwartenden Werten. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß hinsichtlich der Reaktion mit dem AFP spezifischen Antikörper kein Unterschied zwischen Standard- und endogenem-AFP vorliegt.

4.) Einfluss des mehrmaligen Einfrierens der Seren auf die AFP-Werte

Ruoslathi und Seppälä fanden mittels Polyacrylamid Elektrophorese zwei elektrophoretisch unterschiedliche AFP-Moleküle mit einem Molekulargewicht von 70.000 und 140.000. Beide Moleküle zeigten jedoch identische Reaktionen mit einem AFP-Antikörper. Da das AFP-Molekül mit dem Molekulargewicht 140.000 nicht aus nativem Serum gewonnen werden konnte, sondern nur aus Serum, das wiederholt eingefroren und wiederaufgetaut wurde, schlossen sie, daß es sich hierbei um eine artefizielle Formation von zwei Monomeren handele, die sich bei wiederholtem Gefrieren und Auftauen bilden würde (181).

Zur Klärung der Frage, ob das Einfrieren und Auftauen von AFP-haltigem Serum bzw. mehrfaches Wiederholen dieses Vorganges einen Einfluss auf die später gemessene AFP-Konzentration hat, wurden hier die AFP-Spiegel im Serum von 3 schwangeren Frauen bestimmt. Anschließend wurden die Seren eingefroren, wieder aufgetaut und die AFP-Konzentration erneut bestimmt. Mit 2 dieser Seren wurde dieser Vorgang viermal wiederholt. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied in den jeweils gemessenen AFP-Konzentrationen (Abb. 7). Die Konzentrationschwankungen lagen mit einem Variationskoeffizienten von 6,04 bzw. 7,88 % in dem gleichen Bereich, wie die bei den Kontrollseren bei mehrfacher Bestimmung aufgetretenen Abweichungen (vgl. Abb. 5).

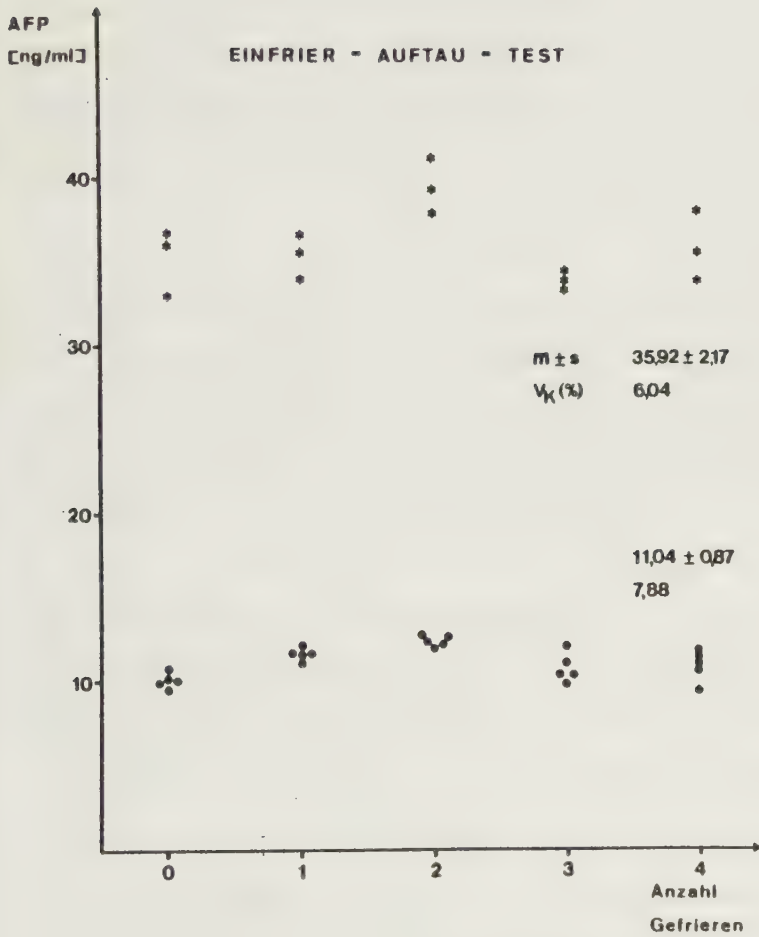


Abb. 7 Messergebnisse nach mehrmaligem Einfrieren der Seren

5.) Verdünnungstest

Fertigt man von einer Lösung mehrere unterschiedliche Verdünnungen an und bestimmt in diesen dann jeweils die Konzentration eines ihrer Bestandteile, dann stehen die hierfür gefundenen Werte in den verschiedenen-konzentrierten Lösungen in gleichem Verhältnis zueinander wie das der Verdünnungen. Multipliziert man nun jeden Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor, so erhält man stets das gleiche Resultat, nämlich den tatsächlichen Titer der zu bestimmenden Substanz in der Ausgangslösung. Gleiches gilt für AFP-haltige Seren, falls in unterschiedlichen Verdünnungen analysiert wurde.

Letzteres war in den durchgeführten Untersuchungen oft bei Seren von Patienten mit sehr hohen AFP-Konzentrationen der Fall, insbesondere bei den von Neugeborenen. Diese Seren wurden von vornherein zur Analyse in mehreren unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, da nicht vorauszusehen war, in welcher Verdünnungsstufe sie sich im Messbereich des Kits befinden würden.

Hierbei lagen nun des Öfteren mehrere, der in verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmten Seren, im Messbereich des Kits. An diesen Seren fiel auf, daß nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor nicht, wie es eigentlich zu erwarten gewesen wäre, gleiche oder doch annähernd gleiche Resultate für den tatsächlichen AFP-Titer des Patientenserums gefunden wurden, sondern daß sie sich in einem Streubereich von oft mehr als 400 % bewegten (vgl. Tab. 7). Deshalb wurden von mehreren Seren systematisch Verdünnungstests durchgeführt. Dazu wurden mehrere, schrittweise angefertigte Verdünnungen desselben Patientenserums im gleichen Kit analysiert. Hierbei

lag der Analyse jeder Serumverdünnung, entsprechend ihrem unterschiedlichen AFP-Gehalt, ein anderer Messbereich des Kits zugrunde. Dieser zugrundeliegende Messbereich hat aber einen wesentlichen Einfluss auf das Messergebnis, wie die durchgeführten Untersuchungen zeigten. Die Tests wurden sowohl in verdünnten als auch unverdünnten Kits durchgeführt. Die Ergebnisse sollen durch die Abbildung 8 erläutert werden. In dieser Abbildung sind auf der y-Achse die AFP-Konzentrationen und auf der x-Achse die verschiedenen Verdünnungen der Seren aufgetragen, die ab der zweiten Verdünnungsstufe jeweils in Schritten von 1 : 11 erfolgten.

Die Werte, die für die im verdünnten Kit analysierten Serumverdünnungen gefunden wurden, sind als Einzelwerte eingezeichnet, für den unverdünnten Kit wurde der Bereich der Einzelwerte eingetragen. Die Messwerte für das gleiche Serum wurden durch eine Kurve miteinander verbunden. Exemplarisch für alle sich entsprechenden Messwerte wurde nur eine Kurve für die im verdünnten und unverdünnten Kit gefundenen Ergebnisse eingetragen. Die Abbildung 8 zeigt im unteren Teil die in den entsprechenden Verdünnungen gemessenen AFP-Werte. Die Kurven nähern sich asymptotisch dem Grenzwert der unspezifischen Bindung bzw. dem kleinsten messbaren Wert. Man misst auch bei weiterer Verdünnung dann stets gleichbleibend den kleinsten messbaren Wert. Bei höheren Konzentrationen, die den Messbereich des Kits übersteigen, nähert sich der gemessene Wert dem Grenzwert, der durch die unspez. Bindung vorgegeben ist.

Tab. 7 Vergleich der AFP-Konzentrationen in verschieden verdünnten Seren

Name	Messwerte	Mittelwert	verd. Faktor	tats. Konz.
verdünnter Kit				
R. 8.12.	188,3 161,3	174,8	231	40379
	62,2 62	62,1	2541	157796
	11,7 11,8	11,75	27951	328424
K. 8.12.	107 157,9	132,3	231	30561
	36,7 39,4	38,05	2541	96685
	6,8 7,2	7,0	27951	195657
D. 8.12.	135,9 154	144,95	231	33483
	49,5 50,5	50,0	2541	127050
	8,4 8,6	8,5	27951	237583
D. 9.12.	128 116,7	122,35	231	28262
	39 37,3	38,15	2541	96939
	7 7,6	7,3	27951	204042
S. 9.12.	142,9 168,5	155,7	231	35967
	56,7 58,7	57,7	2541	146616
	10,5 11,7	11,1	27951	310256
S. 9.12.	171,2 174	172,6	231	39871
	62,6 56,7	59,65	2541	151571
	9,6 10,7	10,15	27951	283703
unverdünnter Kit				
S. 8.12.	247,1 243,7	245,4	231	56687
	12,7 7,1	9,9	2541	25156
M. 8.12.	386,7 373,5	380,1	231	87803
	28 31,3	29,65	2541	75341
K. 8.12.	549,4 567,9	558,65	231	129048
	73,8 66,3	70,05	2541	177997

Tabelle 22: Erreichte F-Werte bei angesteuertem F = 6

F:6 Rang- folge	erreich- ter F-Wert	Differenz vom Sollwert in %	$\bar{x}$	Variations- breite
1	5,189	- 13,6	5,740	1,163
2	5,680	- 5,4		
3	6,352	+ 5,8		
1	5,638	- 6,1	5,946	0,883
2	5,680	- 5,4		
3	6,521	+ 8,6		
1	5,203	- 13,3	5,739	0,809
2	6,002	+ 0		
3	6,012	+ 0,2		
1	5,258	- 12,4	5,438	0,365
2	5,433	- 9,5		
3	5,623	- 6,3		
1	5,380	- 10,4	5,776	0,947
2	5,622	- 6,3		
3	6,327	+ 5,4		
1	5,953	- 0,8	6,366	6,65
2	6,542	+ 9		
3	6,603	+ 10		
1	5,351	- 10,9	5,642	0,767
2	5,458	- 9,1		
3	6,118	+ 1,9		
1	5,774	- 3,8	6,208	0,795
2	6,281	+ 4,6		
3	6,569	+ 9,4		
1	5,758	- 4,1	5,847	0,223
2	5,803	- 3,3		
3	5,981	- 0,4		
1	5,089	- 15,2	5,726	1,055
2	5,945	- 1		
3	6,144	+ 2,4		

In dem dazwischen liegenden, durch die Standardwerte vorgegebenen Messbereich des Kits, müsste man gemäss den vorgenannten Ausführungen für die AFP-Werte der Verdünnungsreihe eine lineare Funktion erhalten. Wie man sieht, gilt dies jedoch nur für einen schmalen Sektor des Messbereichs, der im verdünnten Kit zwischen 0,7 und 25 ng und im unverdünnten Kit zwischen 80 und 240 ng AFP liegt. Die Steigung dieses linearen Abschnittes ist von dem Verhältnis der Verdünnungsschritte zueinander abhängig. Diesem linearen Abschnitt entspricht in den Kurven im oberen Teil der Abbildung ein ebenfalls linearer Bereich, der parallel zur x-Achse verläuft. Dies bedeutet, daß man in diesem Messsektor bei Multiplikation des Messwertes mit dem Verdünnungsfaktor stets das gleiche Resultat erhält, nämlich die tatsächliche Konzentration an AFP im Patientenserum, welche auf der y-Achse abgelesen werden kann.

Es bleibt also zu fordern, AFP-Bestimmungen nur in diesem Sektor durchzuführen, in dem man reproduzierbare Ergebnisse erhält und nicht entlang der gesamten durch die Standardwerte vorgegebenen Eichkurve. Ausserhalb dieses Sektors besteht eine verstärkte Abhängigkeit der Messergebnisse von dem benutzten Messbereich, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt. Eine mathematische Auswertung, die exemplarisch anhand der Messwerte einiger Seren vorgenommen wurde, bestätigte die in Abbildung 8 dargestellten Verhältnisse.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit einem im Handel erhältlichen lyophilisierten AFP-Konzentrat durchgeführt. Bei dieser Untersuchung fanden sich jedoch überraschenderweise nicht die oben geschilderten Ergebnisse. Hierzu wurden 3 AFP-haltige Lösungen benutzt. Die Abbildung 9 zeigt jeweils den Streubereich für die Mittelwerte der AFP-Konzentration für die 3 Seren in den verschiedenen Verdünnungsstufen. Es bestand eine strenge Linearität für den gesamten durch die Standardwerte vorgegebenen Analysenbereich des Kits (Abb. 9). Eine Erklärung für diese Befunde ist bei dem derzeitigen Wissensstand nicht möglich.

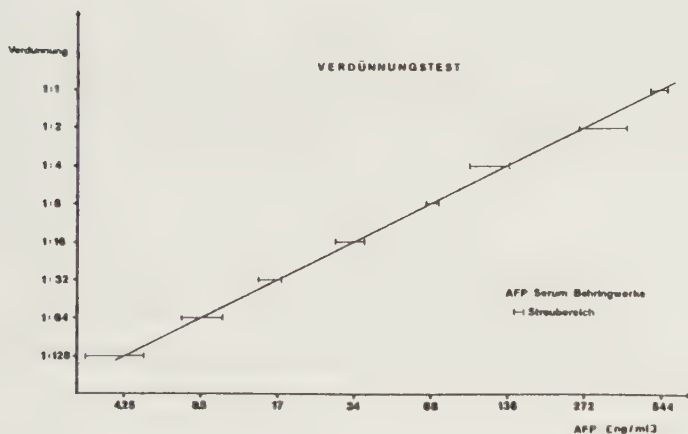


Abb. 9 Verdünnungsreihe eines lyophilisierten AFP-Konzentrates

6.) Variation der Konzentration von radioaktiv markiertem Antigen, Antikörper, Antigen, Polyäthylenglykol und der Messzeit

Zur weiteren Abklärung von Fehlermöglichkeiten und zur Abschätzung der Auswirkung eines Pipettierfehlers auf das Resultat wurden nacheinander die Menge des dem Testansatz zugefügten radioaktiv markierten Antigens (Ag^X), des Antikörpers (Ak), des Antigens (Ag) selbst, also des endogenen AFP in einer Serumprobe und des Fällungsmittels Polyäthylenglykol (PEG) variiert. Für diese Untersuchungen wurde ein Serum mit einem AFP-Gehalt von 34,4 ng/ml benutzt.

In den Abbildungen 10 - 13 wurden auf der Ordinate jeweils die von der vorgeschriebenen Menge abweichende Menge in Prozent angegeben, auf der Abszisse die dazu entsprechend gemessene AFP-Konzentration.

Für das markierte Antigen (Ag^X) und den Antikörper (Ak) wurde die Auswirkung eines Pipettierfehlers von $\pm 15\%$ untersucht (entsprechend 30 μ l), für PEG 20 % (entsprechend 100 μ l). Der Ak wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen analysiert. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse gefunden:

$Ag^X : \pm 15\% = 30 \mu\text{l}$ Messwert 29,8 - 44 ng : Fehler ca. 20,6 %

Ak : $\pm 15\% = 30 \mu\text{l}$ Messwert 32 - 42 ng : Fehler ca. 14,5 %

PEG : $\pm 20\% = 100 \mu\text{l}$ Messwert 29 - 47 ng : Fehler ca. 21,1 %

Die Verhältnisse bei einer Mengenänderung des zugefügten Antigens (Ag) sollen gesondert betrachtet werden. Hierbei sind zwei Fehlermöglichkeiten zu berücksichtigen: Einmal wird die Messmethode durch eine von der vorge-

beschriebenen Testmenge abweichende Serummenge beeinflusst. Diese Abweichung kann in einem Mangel oder Überschuss an Serum bestehen. Ein Mangel oder Überschuss an Serum hat aber auch einen höheren oder niedrigeren Gehalt an AFP im Testansatz zur Folge; dies stellt eine zweite Fehlerquelle dar. Deshalb wurde der gemessene Wert jeweils um den Betrag korrigiert, der durch den fehlenden bzw. überschüssigen Anteil an AFP zustande kam. Die korrigierten Werte in der Abbildung 13 geben also nur den Fehler wieder, der durch einen Mangel oder Überschuss an Serum im Testansatz verursacht wird, unabhängig von dessen AFP-Gehalt. Es zeigte sich, daß eine Mindestmenge an zugefügtem Serum notwendig ist, um eine Ausfällung zu erhalten. Durch Änderungen bis zu 30 % der zugefügten Menge (= 30 µl) kommt nur ein Fehler von 6,6 % zustande. Der Fehler, der durch den fehlenden bzw. zuviel hinzugefügten Anteil an AFP entsteht, entspricht prozentual dem fehlenden bzw. überschüssigen Betrag. Die Untersuchungen mit variabler Antigen (Ag) Konzentration wurden mit einem Serum durchgeführt, das 15,05 ng AFP enthielt.

Als weiterer veränderlicher Parameter wurde die Messdauer der Testansätze variiert. Die Ergebnisse sind anhand der Impulsrate pro Minute (ipm), der relativen Bindungsrate und der absoluten Bindungsrate in Tabelle 8 dargestellt. Die letztere wurde zusätzlich korrigiert unter der Berücksichtigung eines Aktivitätsabfalls von 1 %/Tag bezogen auf die Totalaktivität. Diese Prüfungen wurden an den Standardseren eines Kits durchgeführt. Bei 10^4 ausgezählten Impulsen für B_0 , meistens einer Messzeit von 5 Minuten entsprechend, ist der auftretende Messfehler gegenüber anderen Fehlern zu vernachlässigen. Beträgt die Messzeit nur 1/2 Minute, so ist mit einem Messfehler von ca. 2 % zu rechnen. Der potentielle Fehler ist um so größer, je geringer die Impulsrate ist.

Abb. 10

Einfluss variabler
Konzentrationen von
radioaktiv markiertem
AFP auf das Mess-
ergebnis

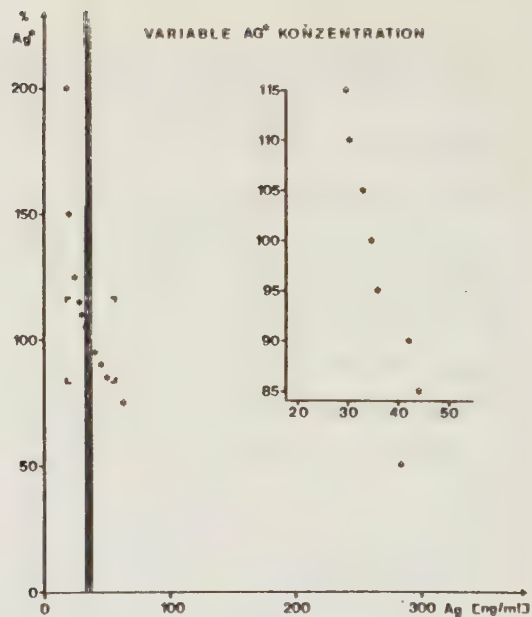


Abb. 11

Einfluss variabler
Konzentrationen des
AFP-Antikörpers auf
das Messergebnis

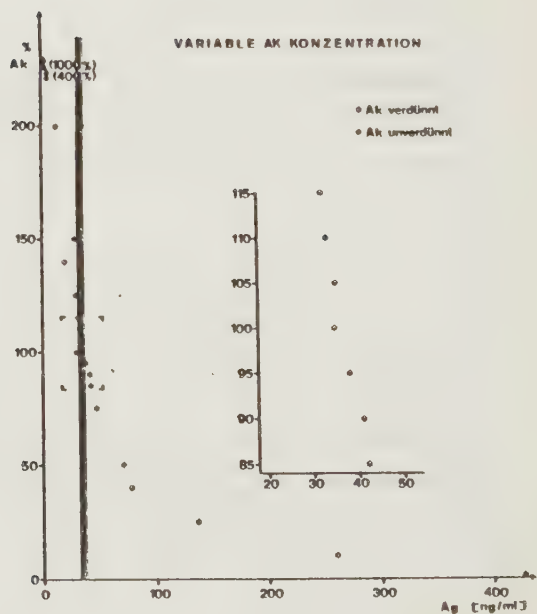


Abb. 12

Einfluss variabler
Konzentrationen des
Fällungsmittels auf
das Messergebnis

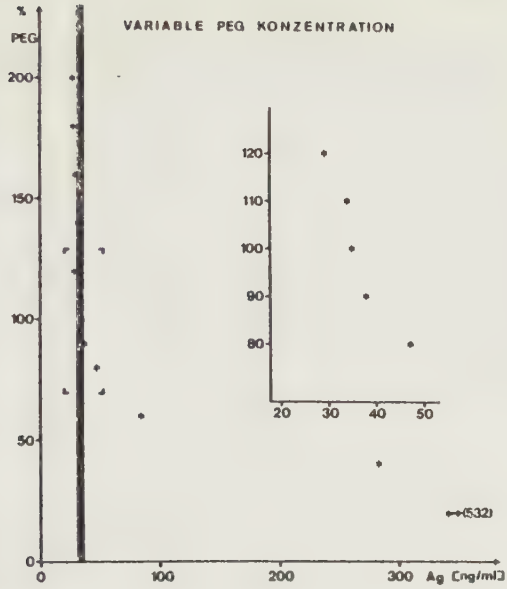


Abb. 13

Einfluss variabler
Serummengen im
Ansatzgemisch auf
das Messergebnis

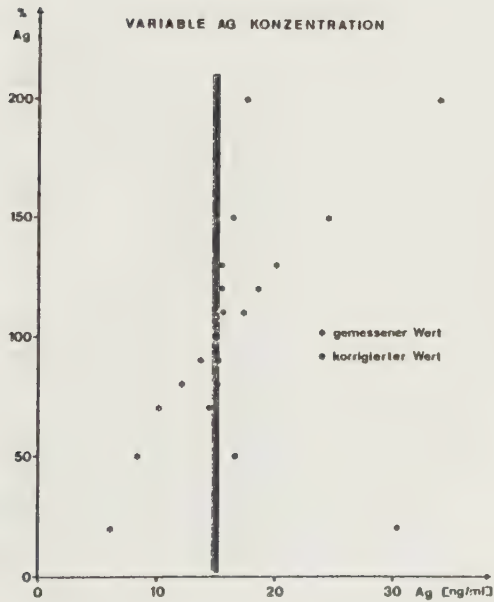


Tabelle 8 Abhängigkeit der Messwerte von der Messdauer

Messzeit (min)	1/2		5		10	
	Ipm	rel. %	Ipm	rel. %	Ipm	rel. %
		abs. 8. korr.		abs. 8. korr.		abs. 8. korr.
Stand. 0	1468		1422		1377	
	1374		1374		1382	
	<u>1448</u>	59,73	<u>1383</u>	58,19	<u>1366</u>	57,43
	1430	59,13	1393	57,61	1375	57,43
Stand. 3	1196	86,2	1221	88,6	1196	89,2
	1342		1284		1285	
	<u>1160</u>	51,5	<u>1196</u>	51,54	<u>1197</u>	51,21
	1233	50,99	1234	51,03	1226	51,21
Stand. 6	1040	72,6	1040	75,3	1045	76
	1088		1061		1042	
	<u>986</u>	43,36	<u>1045</u>	43,82	<u>1047</u>	43,61
	1038	42,93	1049	43,38	1044	43,61
Stand. 12	842	57,8	844	59,9	817	60,2
	798		820		832	
	<u>840</u>	34,54	<u>837</u>	34,84	<u>836</u>	34,58
	827	34,20	834	34,49	828	34,58
Stand. 34	498	36,3	519	37,5	510	37,3
	554		529		515	
	<u>504</u>	21,68	<u>522</u>	21,80	<u>514</u>	21,43
	519	21,46	522	21,59	513	21,43
Stand. 68	396	26,2	381	27,4	399	28,2
	368		382		381	
	<u>376</u>	15,87	<u>380</u>	15,91	<u>385</u>	16,21
	380	15,71	381	15,76	388	16,21
Stand. 136	250	16,8	271	19,3	266	19,1
	232		272		263	
	<u>240</u>	10,17	<u>262</u>	11,19	<u>259</u>	10,99
	241	9,97	268	11,08	203	10,99
Stand. 272	206	13,4	192	14,1	185	13,6
	198		201		190	
	<u>170</u>	7,98	<u>196</u>	8,23	<u>187</u>	7,81
	191	7,82	197	8,15	187	7,81

7.) Abhängigkeit der PEG-Fällung von unterschiedlichen Plasmaprotein-konzentrationen

Wie bereits ausgeführt wurde, beruht das Prinzip der radio-immunologischen AFP-Bestimmung auf der Ausfällung eines Immunkomplexes und der Messung seiner Radioaktivität. Die Ausfällung dieses Präzipitates geschieht mittels Polyäthylenglykol (PEG), welches die Eigenschaft besitzt, das Löslichkeitsprodukt für die Globulinfraktion im Ansatzgemisch zu erniedrigen und diese somit auszufällen.

Es wurde untersucht, inwieweit die AFP-Bestimmungen mittels PEG-Ausfällung durch eine Dysproteinämie beeinflusst werden können. Eine solche ist gerade bei den Patienten vorhanden, bei denen eine AFP-Bestimmung diagnostisch von Interesse ist (z. B. bei Patienten mit Leberzirrhose oder chronischen Lebererkrankungen). Es ist denkbar, daß durch einen erhöhten Globulinhalt des Serums und einen somit voluminöseren Niederschlag, allein unspezifisch eine zu hohe Aktivitätsmenge im Niederschlag haften bleibt. Umgekehrt könnte durch eine verringerte Globulinkonzentration nicht die gesamte gebundene Aktivität zur Ausfällung gelangen. Ausgehend von einer α , β und γ , Globulinlösung mit jeweils 100 mg/ml, wurden Lösungen verschiedener Konzentrationen angefertigt. Es wurde angestrebt, Proteinelösungen zu erhalten, deren Gehalt an Globulinen der physiologischen Plasmakonzentration dieser Globuline annähernd entsprach. Bei den α -Globulinen entsprach die Verdünnung 1 : 11 der physiologischen Plasmakonzentration von 9 mg/ml. Die Verdünnung 1 : 22 der β -Globulinlösung enthielt 4,76 mg Proteine/ml. Der Verdünnungswert zwischen 1 : 5 und 1 : 11 der γ -Globuline lag bei 14 mg/ml. Zunächst bestimmten wir nun den Einfluss dieser Globulinfraktionen in einer Verdünnungsreihe auf die unspezifische Bindungsrate.

Es zeigte sich kein Unterschied in der unspez. Bindungsrate bei Verwendung eines Leeransatzes, eines Humanserums (nicht eingezeichnet), eines Pferdeserums sowie bei der α -Globulinfraktion. Auch die β -Globuline führen im physiologischen Schwankungsbereich zu keinem nennenswerten Einfluss auf die unspez. Bindungsrate. Die γ -Globuline jedoch können in einem unphysiologischen aber biologisch möglichen Schwankungsbereich eine Verschiebung der Werte auf der Bindungskurve um ca. 10 % verursachen (Abbildung 14).

In einer weiteren Untersuchung wurde bestimmt, welche Proteine für eine PEG-Fällung notwendigerweise vorhanden sein müssen. Hierfür wurde in die Testansätze radioaktiv markiertes AFP, der AFP-Antikörper und die zu prüfende Proteinfraktion, jedoch kein AFP-haltiges Serum gegeben. Da bei diesen Versuchsansätzen die Aktivität vollständig gebunden wird, müßte sich in den Testansätzen, in denen eine komplette Ausfällung stattfindet, eine Bindungsrate von 100 % nachweisen lassen.

Wie aus der Abbildung 15 zu ersehen ist, gilt dies für Pferdeserum in einem relativ breiten Konzentrationsbereich. Auch durch Hinzufügen von γ -Globulinen zu den Testansätzen ließ sich eine vollständige Ausfällung mittels PEG erzielen. Es zeigte sich jedoch, daß in geringeren Konzentrationen die Ausfällung nicht vollständig ist, während in höher konzentrierten Lösungen wieder unspez. mehr Aktivität haften bleibt.

Abb. 14

Änderung der unspez.
Bindung bei einer
PEG-Fällung durch
verschieden konzen-
trierte Protein-
lösungen

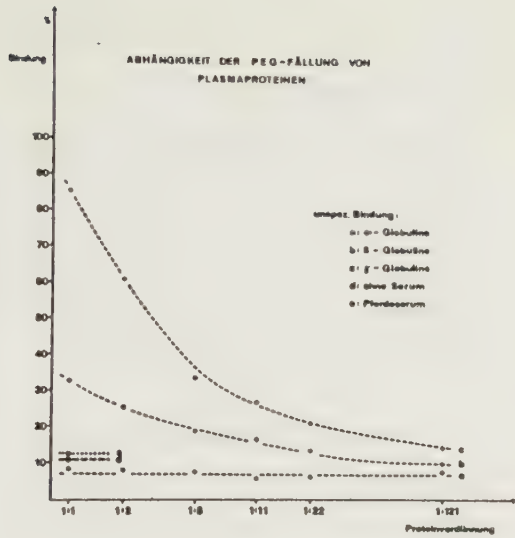
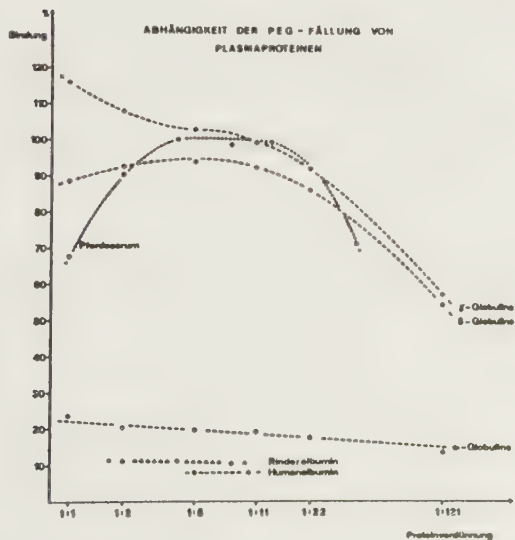


Abb. 15

Änderung der ausge-
fällten Aktivität bei
einer PEG Fällung
durch verschieden
konzentrierte Protein-
lösungen



Bei den β -Globulinen ist die Abhängigkeit der Fällung von der Konzentration nicht so bedeutend, jedoch kommt es durch diese Globulinfraktion allein nie zu einer vollständigen Ausfällung mittels PEG. Dagegen ist die Albuminfraktion für eine PEG-Fällung nicht, die α -Globulinfraktion kaum von Bedeutung. Die nachgewiesene Aktivität entspricht derjenigen, die auch unspez. in den Teströhrchen haften bleibt. Da unter biologischen Bedingungen kaum eine Proteinklasse im Serum vollständig fehlt, sondern es allenfalls zu unphysiologischen Konzentrationsänderungen einzelner Fraktionen kommt, wurde versucht, den Einfluss dieser Plasmaproteinverschiebungen auf die PEG-Fällung zu erfassen.

Hierzu wurden zu einem Poolserum mit definiertem AFP-Gehalt und normalem Plasmaproteinverteilungsmuster unterschiedliche Konzentrationen der drei Globulinfraktionen zugefügt (Abbildung 16).

Es zeigte sich unter diesen Bedingungen zwar auch ein gewisser Einfluss auf die Menge der ausgefällten Aktivität, jedoch liegt der dadurch entstehende Fehler normalerweise in der gleichen Größenordnung wie andere in die Bestimmung eingehende Fehler, die anhand der statistischen Untersuchungen bereits aufgezeigt wurden. Lediglich bei Seren von Patienten mit einer Paraproteinämie oder Agammaglobulinämie muß mit einer Verfälschung der Analysenergebnisse gerechnet werden.

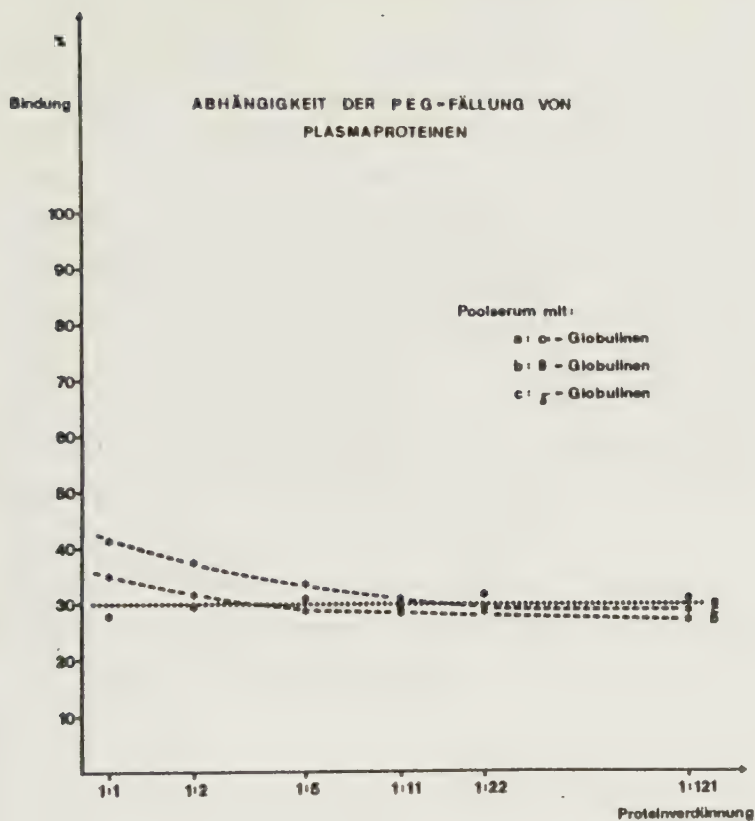


Abb. 16 Änderung der ausgefällten Aktivität bei einer PEG Fällung durch Abwandlung der natürlichen Verteilung der Plasmaproteine

8.) Vergleich der Kits der Firmen Behringwerke und Abbott

Eine weitere Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der im Handel befindlichen RIA's zum AFP-Nachweis der Firma Behringwerke und Abbott.

Die Durchführung der Tests wurde zu Beginn schon ausführlich beschrieben. Der von der Firma Abbott inzwischen vertriebene RIA nach der PEG-Methode unterscheidet sich in der Durchführung und Handhabbarkeit nicht wesentlich von dem der Firma Behringwerke, während die Bestimmung mit der Doppelantikörpermethode einen wesentlich höheren Arbeits- und Zeitaufwand erforderte. Weitere Aussagen können hierzu nicht getroffen werden, da nur ein Kit dieser Art untersucht wurde. Ein gewisser Vorteil des Kits der Behringwerke besteht eventuell darin, daß er nicht tiefgefroren gelagert werden muß. Auch ein Einfrieren und Wiederauftauen oder längeres Lagern der Lösungen scheint die Wiederverwendbarkeit der Reagentien des Behring-Kits nicht in einem solchen Masse zu beeinträchtigen, wie es bei den Reagentien des Abbott-Kits der Fall zu sein scheint.

Um die Vergleichbarkeit hinsichtlich der Analysenresultate zu prüfen, bestimmten wir zunächst mehrere AFP-haltige Seren parallel in den Kits beider Firmen. Hierbei fiel auf, daß sich die Messergebnisse für gleiche Seren in den beiden Kits unterschieden. Zur exakteren Erfassung dieser Unterschiede, und um beide Kits miteinander korrelieren zu können, wurden jeweils die Standardseren, die zur Erstellung der Eichkurve dienten, im Kit der anderen Firma bestimmt.

Die so gefundenen Ergebnisse und ihre Vergleichbarkeit bzw. Unrechenbarkeit mittels der entsprechenden Regressionsgeraden sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

Die Abbildung 17 zeigt die in einem Kit der Firma Abbott analysierten Standardseren der Firma Behringwerke. Es ist zu erkennen, daß die so gemessenen Konzentrationen einen niedrigeren Wert zeigen, als er von der Firma Behringwerke angegeben wird. Entsprechendes erhält man im umgekehrten Fall. Die im Kit der Firma Behringwerke analysierten Standardseren der Firma Abbott zeigen hier höhere Werte, als sie von der Firma angegeben werden. Die Berücksichtigung des Standardwertes zu 544 ng, der jenseits des Messbereiches des Kits der Firma Abbott liegt, hat auf den Verlauf der Regressionsgeraden und auf die Korrelation keinen wesentlichen Einfluss.

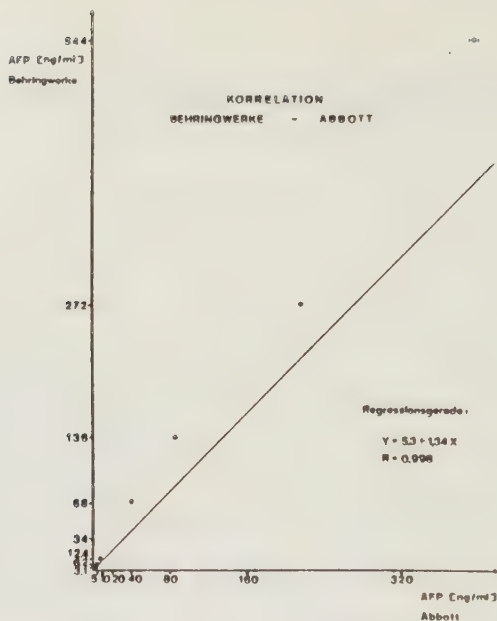


Abb. 17 Analyse von AFP-Präparaten der Firma Behringwerke im Kit der Firma Abbott

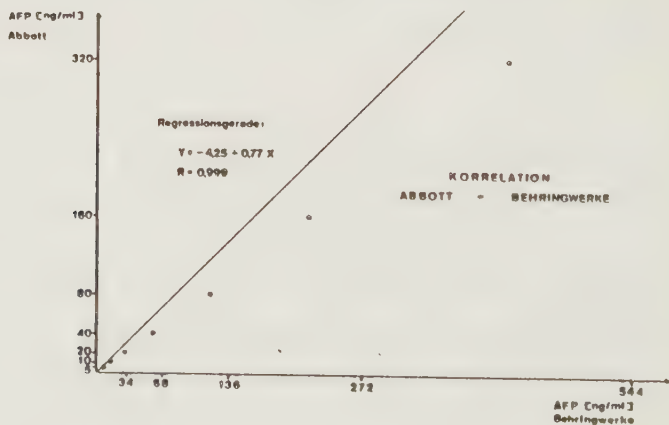


Abb. 18 Analyse von AFP-Präparaten der Firma Abbott im Kit der Firma Behringwerke

III.) PHYSIOLOGISCHE AFP-KONZENTRATIONEN

1.) AFP-Normalwerte bei 2 - 15-jährigen Kindern

Durch die Einführung radioimmunologischer Nachweismethoden konnte gezeigt werden, daß AFP in geringen Konzentrationen auch noch im Serum von gesunden Erwachsenen physiologischerweise vorhanden ist (51, 145, 179, 183, 184).

Vergleichbare Untersuchungen an einem grösseren Kollektiv von Kindern mittels RIA und Bestimmung eines Normalbereiches in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht liegen zur Zeit noch nicht vor. Solche Untersuchungen wurden hier durchgeführt und diesen zunächst willkürlich zwei Altersklassen zugrunde gelegt:

1. Kinder im Alter zwischen zwei und fünfzehn Jahren, bei denen keine AFP-Werte, die wesentlich über denen von gesunden Erwachsenen liegen, zu erwarten waren.
2. Neugeborene und Kleinkinder bis zum zweiten Lebensjahr, bei denen in Abhängigkeit vom Alter mit Sicherheit erhöhte Spiegel erwartet werden konnten.

Zur Bestimmung der Normalwerte der ersten Altersklasse wurden die Seren von Kindern benutzt, die als gesund aus der Klinik entlassen wurden. Ausgewählt wurden nur Patienten mit solchen Erkrankungen, von denen bisher kein Einfluss auf die AFP-Synthese bekannt ist. Von einem Teil dieser Kinder wurde dennoch zur Sicherheit der AFP-Spiegel auch bei Klinikaufnahme und auf dem Höhepunkt der Erkrankung bestimmt. Es zeigten sich

hierbei keine Unterschiede in den AFP-Spiegeln zu denen nach der Genesung, so daß ein krankheitsbedingter Einfluss auf die AFP-Konzentration mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

Von 92 Jungen und 99 Mädchen im Alter zwischen 2 und 15 Jahren wurde der AFP-Wert im Serum bestimmt, um mit diesen Ergebnissen einen Normalbereich für die AFP-Konzentration dieser Altersklasse zu erstellen. Pro Jahrgang wurden mindestens 10, durchschnittlich 14 Serumproben bestimmt.

Die Abbildung 19 zeigt eine Aufstellung der Einzelmessergebnisse bei diesen Kindern. Der Mittelwert beträgt 2,20 ng AFP/ml, die Standardabweichung $\pm 1,08$ ng/ml. Es ergibt sich somit ein 2 s Bereich von 0,04 - 4,36 ng AFP/ml für diese Altersklasse. Zur Errechnung dieser Werte wurde eine Normalverteilung zugrunde gelegt.

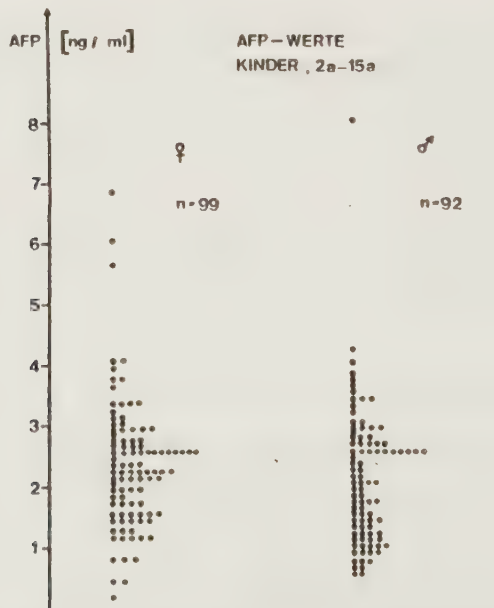


Abb. 19 AFP-Werte bei Jungen und Mädchen zwischen dem 2. und 15. Lebensjahr

Signifikante Unterschiede zwischen den AFP-Werten von Jungen und Mädchen bestanden nicht. Von den 191 Kindern hatten ein Junge und 3 Mädchen Werte, die den 2 σ Bereich überschritten, jedoch unterhalb von 8 ng/ml lagen. Werte unterhalb des 2 σ Bereiches bzw. unterhalb von 0,5 ng/ml können aufgrund der benutzten Bestimmungsmethode nicht mehr differenziert werden (siehe Eichkurven).

Ein Histogramm der Normalwerte zeigt die folgende Abbildung.

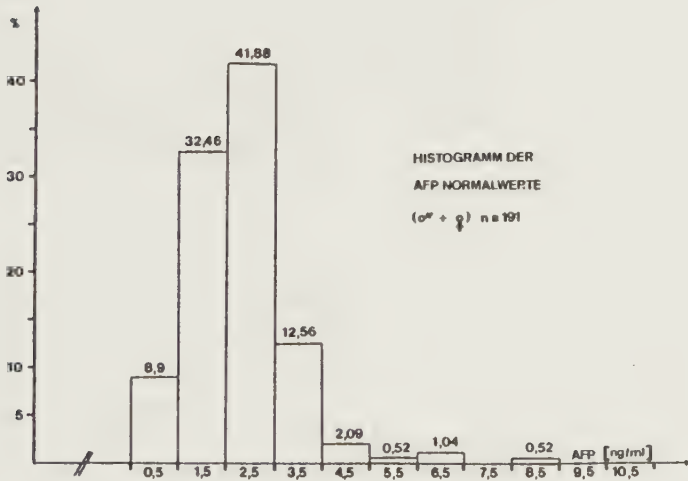


Abb. 20 Histogramm der AFP-Werte von Kindern zwischen dem 2. und 15. Lebensjahr

Das Histogramm (Abb. 20) zeigt, daß es sich bei den Werten dieses Normalbereiches um keine symmetrische Normalverteilung handelt. Zur Veranschaulichung dieser Verhältnisse soll eine Gegenüberstellung von linearer und logarithmischer Auftragung dieser Normalwerte dienen (Abb. 21). Man sieht, daß eine logarithmische Verteilung den gefundenen Werten besser gerecht wird, was auch von Purves und Mitarbeitern (177) bereits beschrieben wurde, während Rouslahti und Mitarbeiter bei 11 bzw. 32 gesunden Erwachsenen annähernd eine Normalverteilung der Serum-AFP-Spiegel mit einem Normalbereich von 1 - 14,2 ng/ml, 1 s Bereich $7,6 \pm 6,6$ ng/ml fanden (179, 184).

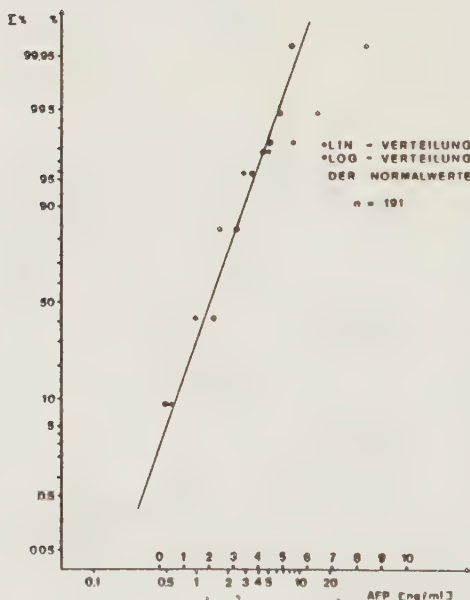


Abb. 21 Gegenüberstellung der linearen und logarithmischen Verteilung der Normalwerte bei Kindern

2.) Änderung des AFP-Spiegels in den ersten beiden Lebensjahren

Die höchsten physiologischen AFP-Konzentrationen ($\bar{x}$ = 200 mg/ml) treten um die 22. Schwangerschaftswoche im fetalen Serum auf, die dann bis zur Geburt wieder auf Werte um 7 mg/ml abfallen. Die AFP-Spiegel liegen bei reifen Neugeborenen zwischen 0 und 20 mg/ml, bei Frühgeborenen zwischen 38 und 68 mg/ml und bei unreifen Neugeborenen zwischen 10 und 150 mg/ml. Die AFP-Konzentration soll dabei in umgekehrtem Verhältnis zur Reife des Neugeborenen stehen. Andere Autoren fanden eine gute Korrelation zwischen dem Logarithmus der Höhe des AFP-Spiegels und dem Alter oder dem Quotienten AFP-Geburtsgewicht zum Gestationsalter (33, 68, 97, 137, 163, 188, 212). Einem sehr starken Abfall des AFP-Spiegels in den ersten 4 - 6 Stunden nach der Geburt folgt ein ziemlich konstanter Spiegel in den folgenden 2 - 4 Tagen. Nach ca. 5 Wochen ist AFP beim gesunden Säugling mittels Immundiffusion normalerweise nicht mehr nachweisbar (33, 97).

Um die Konzentrationen bei Neugeborenen und die Schnelligkeit des Abfalls der hohen Blutspiegel sowie den Zeitpunkt des vollkommenen Verschwindens bzw. des Erreichens des zuvor beschriebenen Normalbereiches, in welchem Synthese- und Abbauraten im Gleichgewicht stehen, zu erfassen, wurden bei 86 Frühgeborenen, Reifgeborenen und Kindern unter 2 Jahren die AFP-Titer im Serum bestimmt. Am ersten Lebenstag fanden sich bei Reifgeborenen Werte zwischen 29.000 und 112.000 ng/ml. Die Werte von Frühgeborenen waren signifikant erhöht und lagen zwischen 200.000 und 350.000 ng/ml.

Spätestens bis zur Vollendung des zweiten Lebensjahres war bei allen Kindern der AFP-Spiegel im Blut auf Werte unter 4 ng/ml abgefallen. Wegen der zu geringen Anzahl der Patienten wurden geschlechtsspezifische Ab-

hängigkeiten bis zum 2. Lebensjahr nicht näher untersucht.

Die folgende Abbildung dient der Veranschaulichung dieser Ergebnisse.

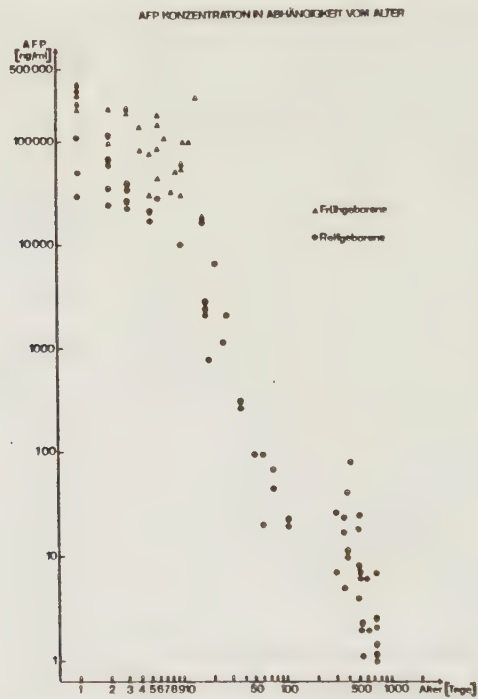


Abb. 22 Abfall der AFP-Konzentration in den ersten zwei Lebensjahren

3.) AFP und Bilirubin bei Neugeborenen

Von 14 Neugeborenen wurde neben der AFP- noch die Bilirubinkonzentration im Serum bestimmt. Die Tabelle 9 gibt die ermittelten Werte so wieder, daß bei einer bestehenden positiven Korrelation die hohen AFP-Werte links oben, die niedrigen rechts unten in der Tabelle zu finden wären (Die AFP-Werte sind hierbei in 1000 ng/ml wiedergegeben). Es fand sich auch bei Berücksichtigung des Gestationsalters keine Korrelation zwischen der Höhe des AFP- und Bilirubinspiegels.

Das zeitliche Verhalten des AFP und Bilirubins wurde zusätzlich im Serum von 5 Säuglingen untersucht (Abb. 23). Auch hierbei zeigte sich keine Korrelation in der Höhe und auch nicht im Verlauf zwischen AFP und Bilirubin. Die Bilirubinspiegel steigen nach der Geburt zunächst deutlich an, während die AFP-Spiegel sofort abfallen. Jedoch zeigte sich, wenigstens tendenzmässig, daß sich dieser Abfall, wie dies bereits von Bergstrand und Mitarbeitern (33, 97) beschrieben wurde, nicht mit gleichbleibender Geschwindigkeit vollzieht. Während der Konzentrationsabfall des AFP am 1. Lebenstag mehr als 100 % beträgt, sinken die AFP-Spiegel vom 3. Lebenstag an wesentlich langsamer, worauf weiter unten noch ausführlich eingegangen wird.

Tab. 9 Zuordnung der AFP-Spiegel zum Gestations- und Lebensalter und Bilirubinspiegel

Bilirubin- spiegel (mg %)	Gestations- und Lebensalter (Wochen)
15	
14	
13	
12	
11	260
10	205 82
9	140 284
8	30
7	310
6	
5	240
4	
3	328
2	51 37
1	32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43

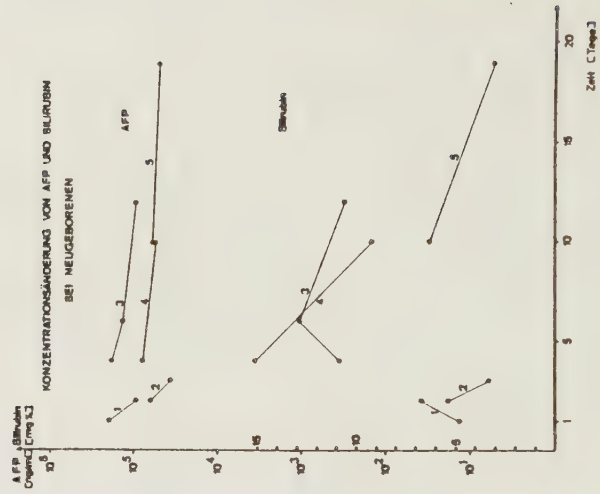


Abb. 23 Gegenüberstellung der AFP- und Bilirubin-
spiegel bei Neugeborenen

4.) AFP-Halbwertszeit bei Neugeborenen

Die Halbwertszeit von AFP wurde anhand des Abfalls der hohen AFP-Werte bei Säuglingen bestimmt. Vereinfacht wurde angenommen, daß sich der Abfall monofunktionell gemäss einer einfachen e-Funktion $C = C_0 e^{-kt}$ vollzieht. Diese Voraussetzung ist nur jeweils für bestimmte Zeitabschnitte gültig, deshalb wurde allein eine graphische Bestimmung der HwZ vorgenommen. Hierzu wurde die AFP-Konzentration logarithmisch auf der Ordinate, das Lebensalter linear auf der Abszisse aufgetragen (Abb.24a). Es wurden keine Einzelverlaufsbestimmungen durchgeführt, sondern alle Serumkonzentrationen in Zeitabhängigkeit gemittelt. Diese Bestimmungsmethode ist zwar mit einem gewissen Fehler behaftet, gibt unter Kenntnis und Beachtung der folgenden Voraussetzungen jedoch einen guten Mittelwert wieder:

1. Am ersten, eventuell noch zweiten Lebenstag, fällt die AFP-Konzentration im Serum offenbar schneller ab als in der folgenden Zeit.
2. Mit zunehmendem Alter nähert sich der AFP-Wert asymptotisch einem Basiswert (Normalbereich), in welchem Verlust- und Syntheserate im Gleichgewicht stehen.
3. Intermediär scheint der AFP-Abfall ziemlich konstant zu sein.

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurde der Bereich jenseits eines Alters von 7 Wochen ausgeklammert. Die AFP-Konzentration ist zu dieser Zeit schon auf so niedrigen Werten angelangt, daß die ständige, wenn auch minimale Syntheserate prozentual doch hoch ins Gewicht fällt und nicht mehr vernachlässigt werden darf.

Wie die Abbildung 24a zeigt, wurde mit dieser Methode ein Abfall des AFP auf die Hälfte des Ausgangswertes in frühestens 3,04 und spätestens 3,6 Tagen gefunden. In einer zweiten Abbildung (Abb. 24b) wurde der Einfluss des Gestationsalters auf die Höhe des AFP-Spiegels ausgeschaltet. Dazu wurden die AFP-Werte nicht dem Lebensalter sondern ihrem Gestations- und Lebensalter entsprechend aufgetragen. Dabei wurden die Frühgeborenenwerte um soviel Wochen auf der Zeitachse nach links verschoben, wie die Geburt zu früh stattfand, so daß alle Werte auf eine Schwangerschaftsdauer von 40 Wochen bezogen wurden. Der Streubereich der Einzelwerte in bezug auf das zugehörige Lebensalter ist hierbei sichtbar kleiner geworden. Auch der Einfluss des in den ersten Lebenstagen beobachteten schnelleren Abfalls auf die Bestimmung der Halbwertszeit wurde durch diese Methode zum Teil ausgeschaltet, was sich in einer Erhöhung des einen Extremwertes der Halbwertszeit von 3,04 auf 4,67 Tage zeigt. Weiterhin können aufgrund dieser Darstellung folgende Feststellungen getroffen werden:

1. Der Abfall des AFP-Spiegels findet schon vor der Geburt statt. Demzufolge liegt der AFP-Spiegel bei Normalgeborenen zur Zeit der Geburt niedriger als bei Frühgeborenen.
2. Die im Serum von Frühgeborenen vorkommenden erhöhten AFP-Spiegel liegen bei dieser Darstellungsart in dem Streubereich der AFP-Werte, der für Normalgeborene gefunden wurde.

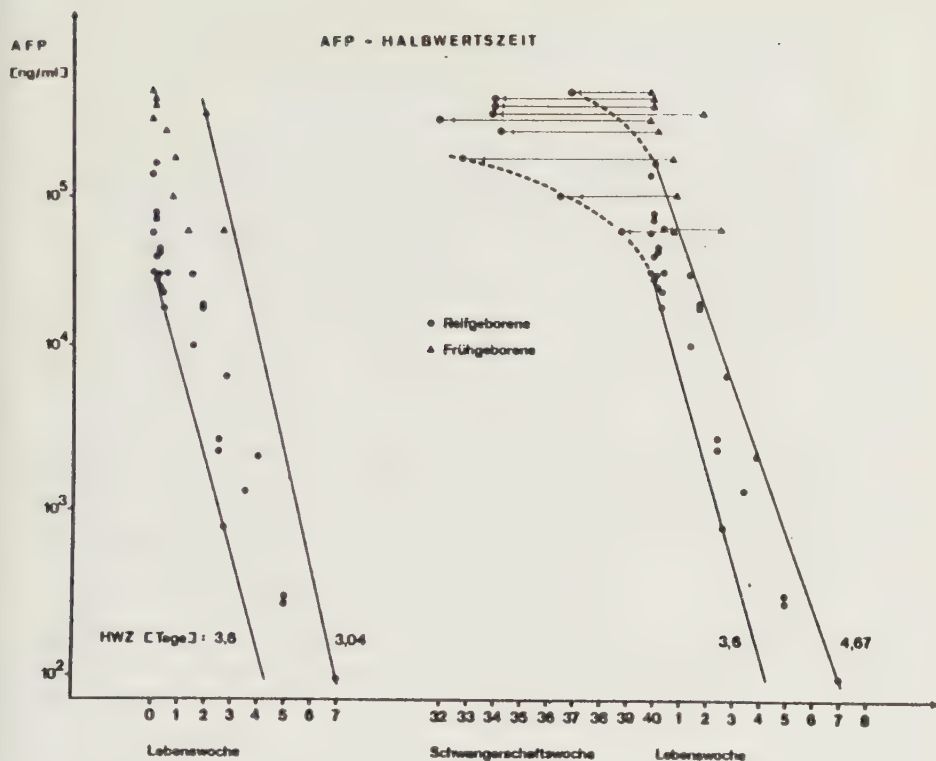


Abb. 24a
Abfall der AFP-Konzentration in den ersten Lebenswochen

Abb. 24b
Normierung der AFP-Spiegel von Früh- und Reifgeborenen auf gleiche Schwangerschaftsdauer

IV.) ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN

1.) Patienten mit Lebererkrankungen

Seit der Einführung des RIA zum Nachweis von AFP im Serum wurden erhöhte AFP-Werte nicht mehr allein beim malignen Hepatom und Teratom gefunden, sondern unter anderen auch bei den verschiedenartigsten Lebererkrankungen, wenn auch nicht in einem solch hohen Prozentsatz und in solch hoher Konzentration wie bei den erwähnten Malignomen (8, 12, 19, 34, 36, 37, 45, 48, 49, 60, 98, 99, 104, 168, 171, 182, 185, 204, 210).

Durch diese Beobachtungen veranlasst, wurden viele Untersuchungen zur Klärung der Frage durchgeführt, ob der AFP-Spiegel im Serum bei Patienten mit Lebererkrankungen mit anderen klinischen Daten korreliert. Der AFP-Wert wurde in Beziehung gestellt zur Schwere der Erkrankung, zu dem Australia-Antigen Befund, zu der klinischen und histologischen Form der Leberaffektion, zur Prognose und zu anderen klinisch-chemischen Laborbefunden.

Um die vorliegenden Ergebnisse auf diesem Gebiet durch Untersuchungen bei Kindern zu ergänzen, bei denen nach Überlegungen der Arbeitsgruppen von Bagshawe, Masopust und Masseyeff eine AFP-Neosynthese bei Leberaffektionen und anderen AFP-produzierenden Prozessen sogar noch eher zu erwarten ist als bei Erwachsenen (20, 139, 145, 148), wurden bei 48 Kindern mit verschiedenen Lebererkrankungen die AFP-Werte bestimmt.

Sämtliche wichtigen klinischen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Einheiten: GOT und GPT in mU/ml, AFP in ng/ml).

Tabelle 10 Klinische Daten der Patienten mit Lebererkrankungen

N.N.	Diagnose	Histologie	GOT/GPT	HB _s Ag	Geb.Dat.	AFP	Therapie
B.G.	CPH	kein Umbau	70/87	pos.	27.12.58	1,4	-
F.M.	CPH	kein Umbau	42/45	pos.	15. 1.65	3,1	-
X.X.	CPH	kein Umbau	40/50	pos.	17. 6.68	1,1	-
F.S.	CPH	kein Umbau	59/77	pos.	20.10.66	4,9	-
H.K.	CPH	kein Umbau	37/39	pos.	5. 5.63	2,2	-
H.S.	CPH	kein Umbau	23/34	pos.	28.10.70	0,2	-
S.R.	CPH	kein Umbau	32/39	pos.	14. 8.70	1,1	-
W.O.	CPH	kein Umbau	45/66	pos.	6.10.65	3,0	-
G.M.	CAH	kein Umbau	39/42	pos.	7. 1.70	3,3	-
Z.M.	CAH	in Vollrem.	kl.20	neg.	18. 2.64	0,7	+
V.D.	CAH	kein Umbau	330/425	pos.	18. 7.72	9,2	-
V.A.	CAH	kein Umbau	32/49	pos.	22. 5.69	0,9	-
S.U.	CAH	fortge.Umbau	49/77	pos.	1.12.66	1,4	+
R.J.	CAH	Stad.d.Zirr- hose	52/101	pos.	29. 6.62	9,9	+
R.J.	CAH	beg. Umbau	137/158	pos.	30. 4.65	1,0	+
R.G.	CAH	kein Umbau	22/32	pos.	15.11.64	0,5	-
M.G.	CAH	fortg.Umbau St.d.Zirr.	209/256	pos.	2. 6.63	2,3	+
M.A.	CAH	fortg.Umbau Zirrrose	62/104	pos.	17. 6.61	10,7	+
M.N.	CAH	beg. Umbau	330/770	pos.	20.10.73	0,9	+
L.M.	CAH	kein Umbau	170/175	pos.	24. 6.73	2,2	+
K.P.	CAH	beg. Umbau	66/130	pos.	30. 4.69	0,5	+
J.M.	CAH	kein Umbau	93/209	pos.	18. 7.74	2,0	-
H.V.	CAH	kein Umbau	56/160	pos.	31. 8.68	0,7	-

N.N.	Diagnose	Histologie	GOT/GPT	Hb _s Ag	Geb.Dat.	AFP	Therapie/Zusatzdia
C.K.	CAH	beg. Umbau	52/70	pos.	10. 4.73	3,6	-
B.J.	CAH	kein Umbau	86/108	pos.	23. 2.64	0,9	+
B.K.	CAH	fortg.Umbau	190/154	pos.	12. 4.64	4,3	+
B.R.	CAH	fortg.Umbau Autoimmuntyp	175/245	neg.	-	1,0	+
S.M.	AH	-	56/72	neg.	19. 1.72	0,6	Diät
S.A.	AH	-	65/115	neg.	27. 9.71	2,6	Diät
P.S.	AH	-	330/1010	neg.	23. 9.71	8,7	Diät
K.B.	AH	-	280/930	neg.	10.12.72	3,2	Diät
J.C.	AH	-	70/120	neg.	22.11.68	0,7	Diät
C.B.	AH	-	210/1085	pos.	13. 6.63	4,3	Diät
S.A.	PVAH	-	26/42	pos.	29.11.65	0,4	-
C.A.	PVAH	-	127/170	neg.	-	15,6	-
E.J.	PVAH	-	70/80	neg.	2. 3.66	1,2	-
B.M.	PVAH	-	45/52	pos.	13.10.70	2,2	-
B.C.	Min.Hep.	+	16/24	pos.	4. 9.63	2,6	ALL
B.A.	Min.Hep.	+	10/12	pos.	10. 9.64	0,4	Lymphosarkom
S.K.	Min.Hep.	+	k1.20	pos.	26. 1.62	2,9	Hodgkin
S.J.	Min.Hep.	+	k1.20	pos.	24. 6.63	3,0	Medulloblastom
O.C.	Zirrrose	sek.bil.Z. Gg-atresie	300/400	neg.	24.11.75	2,5	-
H.H.	Zirrrose	Mukovisz.	55/75	neg.	-	1,3	-
S.G.	Zirrrose	kryptog.Z.	35/42	neg.	18. 6.62	2,3	-
O.K.	Zirrrose	b.M.Wilson	30/45	neg.	19. 2.76	1,2	-

N.N.	Diagnose	Histologie	GOT/GPT	HB _s Ag	Geb.Dat.	AFP	Therapie/Zusatzdiät
R.F.	Fettleber	beg. Umbau	50/70	neg.	30. 5.62	1,2	-
B.U.	Fettleber	beg. Umbau	-	neg.	5. 9.58	5,7	-
G.B.	Zust.n.extrahepat. Gallengangsatriesie		-	neg.	29. 5.68	2,0	-
L.J.	Neonat.H. Riesenzeilh. St.fort.Z.		45/45	neg.	13. 4.76	973	Diät

Mit Ausnahme der akuten Hepatitiden wurden alle Diagnosen biopsisch gesichert. Die AFP- und Enzymbestimmungen bei Kindern mit akuter Hepatitis wurden synchron durchgeführt, und zwar ist jeweils der Wert nach 7 Tagen Klinikaufenthalt wiedergegeben. Die AFP- und Enzymwerte der übrigen Patienten wurden anlässlich einer ambulanten Kontrolluntersuchung ebenfalls synchron bestimmt.

Von den 19 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis wurden 12 mit einer immunsuppressiven Kombinationstherapie von 10 - 15 mg Decortin und 50 mg Azathioprim behandelt. Im wesentlichen handelt es sich dabei um die Patienten, bei denen im histologischen Präparat ein beginnender oder fortgeschrittener Umbau gefunden wurde.

Alle übrigen Patienten erhielten keine Medikamente. Die Kinder mit akuter Hepatitis bekamen eine eiweissreiche, fettarme und kohlenhydratreiche Leberschondität.

Bei den Patienten mit einem malignen Grundleiden fanden sich nach einer Transfusionshepatitis histologisch minimalste Veränderungen im Sinne einer chronischen Hepatitis (minimal change hepatitis). Bei diesen Kindern wurde die vorbestehende maligne Grunderkrankung auf der Tabelle mitaufgeführt.

Von 19 Kindern mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH) zeigten 3 Kinder AFP-Werte, die oberhalb des 2 s Bereiches lagen, von 8 Kindern mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH) sowie von 4 Kindern mit protrahiertem Verlauf einer akuten Hepatitis (PVAH) und 6 Kindern mit akuter Hepatitis (AH), zeigte jeweils nur ein Kind Werte jenseits des 2 s Bereiches. Ein Kind mit CAH und ein Kind mit AH zeigten Grenzwerte.

Abbildung 25 zeigt diese Verhältnisse nochmals, wobei der 1. und 2. Bereich markiert ist.

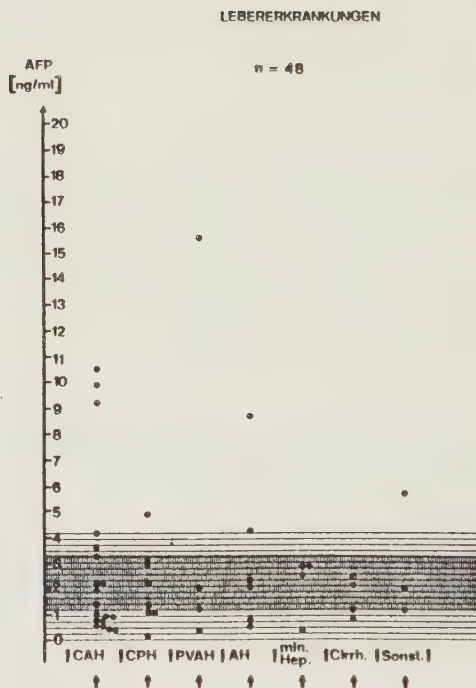


Abb. 25

AFP-Spiegel bei Kindern mit Lebererkrankungen

2.) Patienten unter Zytostatikatherapie

Wenn man bei Patienten mit malignen Tumoren bzw. bei Risikogruppen, für die die Gefahr der Entwicklung eines Malignoms besteht, einen Einfluss auf die Neosynthese von AFP annehmen oder diskutieren will, sind 3 Mechanismen zu erörtern:

1. Bei Patienten mit genetisch bedingten Veränderungen und einer eventuellen späteren Tumormanifestation ist eine AFP-Erhöhung schon vor einer potentiellen Tumormanifestation nachweisbar, wie das bei der Ataxia teleangiectatica der Fall ist.
2. Durch den Wegfall der Repression an dem für die AFP-Synthese zuständigen Ort des Genoms wird AFP im Tumorgewebe in grösserer Menge synthetisiert und in das Blut ausgeschwemmt, wie dies für maligne Hepatome und Teratome in hohem Masse zutrifft.
3. Die Möglichkeit der Beeinflussung des AFP-Spiegels durch eine Tumorthherapie mit Zytostatika oder Leberbestrahlung.

Auf die Punkte 1 und 2 soll nicht eingegangen werden, da zu diesen Gruppen keine Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Ein Kind mit Ataxia teleangiectatica wies zwar einen erhöhten AFP-Wert von 932 ng/ml auf, es wurde aber innerhalb des Untersuchungszeitraumes kein Tumor nachgewiesen.

Bei einem Kind mit malignem Teratom, das zur 2. Gruppe zu rechnen wäre, wurden über einen Zeitraum von 10 Wochen, sowohl prae-, als auch postoperativ, normale AFP-Werte im Serum bestimmt.

Das Interesse galt den Patienten der 3. Gruppe, die wegen eines Malignoms, das nicht selbst AFP produziert, mit zytostatischen Substanzen therapiert wurden. Seit der Einführung dieser Medikamente in die Therapie wird auch ihre Kanzerogenität diskutiert (43, 82). Als potentiell gefährdetes Organ steht dabei die Leber wegen ihrer zentralen Stellung im Stoffwechsel mit im Vordergrund.

Untersucht wurden vor allem diejenigen Patienten, die mit alkylierenden Substanzen und/oder Methotrexat behandelt wurden. Die Lebertoxizität von alkylierenden Substanzen, wie auch die Induktion maligner Hepatome, sowohl beim Tier aber auch beim Menschen, ist hinreichend bekannt (24, 25, 39, 106, 107, 156, 169, 173, 203, 224). Auch die Lebertoxizität von Methotrexat beim Menschen wurde beschrieben (54). Eine direkte oder indirekte Kanzerogenität eventuell die Entwicklung eines Hepatoms über eine Zirrhose unter Methotrexat-Therapie wird diskutiert (59).

Sollte eine Leber überhaupt unter zytostatischer Therapie eine AFP-Synthese zeigen, so müsste dies besonders bei Kindern der Fall sein. Nach einer Schädigung erwartet man von einer kindlichen Leber viel eher und eine intensivere AFP-Synthese als von der Leber des Erwachsenen (20, 139, 145). Deshalb wurden die entsprechenden AFP-Bestimmungen durchgeführt.

Die Bedeutung einer transitorischen AFP-Erhöhung, die sowohl in chemisch induzierten Hepatomen bei Ratten, als auch einige Jahre vor manifest werden von Hepatomen bei Menschen beobachtet wurden (90, 106, 107, 135, 173, 176), soll später diskutiert werden.

AFP-Erhöhrungen, die durch das Malignom allein bedingt sind, wurden in der Literatur nicht beschrieben (3, 34, 95, 96, 138, 146, 147, 216). Finkel-

stein fand zwar bei Verwendung eines Antiserums gegen Rhesusaffen-AFP bei 1 von 7 Fällen mit Lymphosarkom sowie bei 1 von 13 Fällen mit Neuroblastom und bei 3 von 13 Fällen mit Rhabdomyosarkom AFP-Erhöhungen mittels Mikro-Ouchterlony Technik, konnte diese aber bei Verwendung eines gegen menschliches AFP gerichteten Antikörpers nicht nachvollziehen (67).

Bei 72 Kindern, die unter zytostatischer Therapie standen, wurden die AFP-Werte im Serum bestimmt. Als Vergleichsgruppe wurden 17 Patienten gewählt, die wegen eines Malignoms (in der Mehrzahl Kleinhirn-Astrozytome, Kranio-pharyngeome und Ependymome) nur bestrahlt wurden.

Insgesamt fanden sich bei 13 von den 72 hier untersuchten Kindern geringfügig erhöhte AFP-Spiegel. Bei 3 Patienten, bei denen noch vor Therapiebeginn AFP-Bestimmungen durchgeführt werden konnten, bestanden zunächst normale Werte, die dann 9, 21 und 22 Tage nach Beginn der Medikation anstiegen. Bei einem Patienten fielen die 14 Tage nach Behandlungsbeginn erhöhten Werte nach 5 Wochen wieder in den Normbereich ab.

Die nachfolgende Abbildung und Tabelle gibt einen Überblick über die gefundenen Werte. Die vorgenommene Einteilung wurde im Hinblick auf die bei den einzelnen Erkrankungen durchgeführte Chemotherapie gewählt.

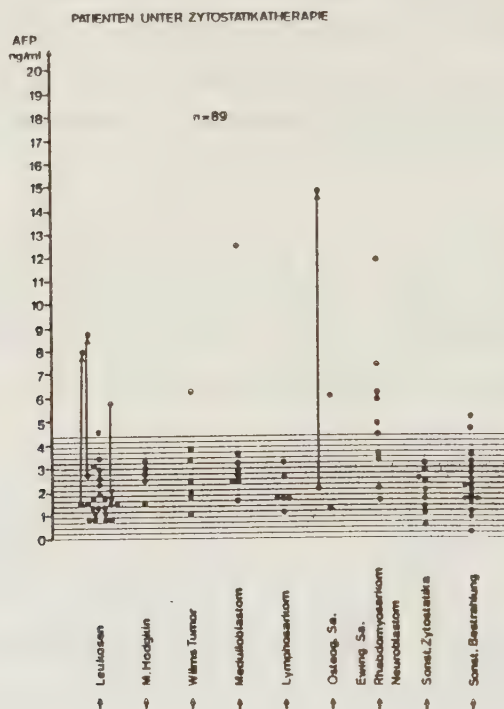


Abb. 26

AFP-Spiegel bei Kindern unter Therapie mit Zytostatika

Tabelle 11 Zuordnung der pathologischen AFP-Werte zum Behandlungsschema

Diagnose	Zahl	+ AFP	Therapieschema	Zytostatika
Leukosen	24	4	Pinkel Schema Radiatio d. Schädels	VCR, MTX, END 6-MP, PRED
M. Hodgkin	5	0	modif. de Vita Schema OP + Radiatio + Zytost.	END, VIN, Natulan, PRED
Wilm's Tu	7	1	OP + Radiatio + Zytost.	ACD, (ACD, VCR) (ACD, VCR, ADM)
Medullo- blastom	8	1	OP + Radiatio + Zytost.	END, VCR
Lympho- sarkom	6	0	Polychemother. + Radiatio Induktion Konsolidation Erhaltung	END, VCR, DB, MTX 6-MP, Cyt-Ar, END 6-MP, END, DB, VCR, Cyt-Ar, MTX
Osteogenes Sarkom	3	2	Monotherapie	MTX, Citrovorum F.
Rhabdomyo- sarkom				
Neuroblastom	10	5	Polychemotherapie + Radiatio	END, VCR, ACD, ADM
Ewing-Sarkom				

As = L-Asperaginase, Craenitin^R ACD = Actinomycin D, Lyovac-Cosmegen^R
 ADM = Adriamycin, Adriablastin^R Citrovorum Faktor (= spez. Antidot zum
 Folsäureantagonisten MTX) Cyt-Ar = Cytarabin, Alexan^R DB = Daunorubicin,
 Daunoblastin^R END = Cyclophosphamid, Endoxan^R 6-MP = 6-Mercaptopurin,
 Puri-Nethol^R MTX = Methotrexat PRED = Prednison Procarbazin =
 Natulan^R VCR = Vincristin VIN = Vinblastin, Velbe^R

Die ausführlichen Behandlungsschemata sind bei Burkert (46) und Gutjahr (81) beschrieben.

Die mit Zytostatika behandelten Patienten, die eine AFP-Erhöhung aufwiesen, gehören bis auf einen in die Gruppe der mit Actinomycin D (ACD) (6) oder Methotrexat (MTX) (6) behandelten Patienten. Bei Kindern mit osteogenem Sarkom wurde eine Monotherapie mit Methotrexat (MTX) durchgeführt. Dabei wurde der Folsäureantagonist in extrem hoher Dosierung (6000 bis 9000 mg/m² Körperoberfläche) über mehrere Stunden infundiert und den Kindern anschliessend das spezifische Antidot Citrovorum-Faktor verabreicht. 2 von 3 so behandelten Kindern zeigten eine AFP-Erhöhung, bei diesen bestand gleichzeitig eine toxisch bedingte Transaminasenerhöhung mit Werten von 400 und 700 mU/ml.

Eine AFP-Erhöhung unter Vincristin (VCR), Endoxan (END) und Adriamycin (ADM) kam nur einmal vor, obwohl die mit diesen Substanzen behandelten Patienten den überwiegenden Anteil des untersuchten Kollektivs ausmachten. Die Tabelle 12 zeigt eine Zusammenstellung.

Im Serum von 18 Patienten wurden AFP-Bestimmungen nach Absetzen der zytostatischen Therapie durchgeführt (Zeitraum unmittelbar nach Beendigung bis 8 Jahre nach Therapieende, $\bar{m} = 2,7$ Jahre nach Therapieende). Es zeigten sich keine AFP-Erhönungen im Serum dieser Kinder.

Wegen der zu geringen Patientenzahl in den einzelnen Gruppen musste von einer statistischen Analyse der Ergebnisse abgesehen werden.

Zu erwähnen bleibt noch, daß bei einem Mädchen, bei dem wegen eines Rhabdomyosarkoms der Leber eine Teilhepatektomie durchgeführt wurde, stets normale AFP-Spiegel im Serum gefunden wurden.

Tabelle 12 Zuordnung der erhöhten AFP-Werte zu einem Zytostatikum

N.N.	Geb.Dat.	Zytostatikum	AFP	Diagnose
B.A.	26. 3.71	MTX o. 6-MP	8,0	Leukose
H.E.	23. 7.72	MTX o. 6-MP	9,0	Leukose
S.V.	29. 1.73	MTX o. 6-MP	5,8	Leukose
D.B.	1.11.66	MTX o. 6-MP	4,5	Leukose
M.K.	31. 8.70	ACD	6,3	Wilm's Tu.
A.J.	21.11.67	MTX	6,1	Osteog.Sark.
S.C.	2. 5.67	MTX	14,8	Osteog.Sark.
S.V.	23. 5.74	ACD	11,9	Rhabdomyosark.
S.D.	1.11.66	ACD	7,5	Rhabdomyosark.
H.F.	5. 8. 66	ACD	6,3	Neuroblastom
B.J.	4. 4.64	ACD	6,1	Neuroblastom
F.S.	20.10.66	ACD	4,9	Ewing Sarkom
N.J.	3. 7.73	VCR/END	12,5	Medulloblastom

3.) Patienten mit Mukoviszidose

Chandra und Mitarbeiter (50) sowie Smith (208) fanden bei Kindern mit Mukoviszidose erhöhte AFP-Werte im Serum. Das erstgenannte Arbeitsteam untersuchte das Serum von 18 Kindern mit dieser Erkrankung, die mit Ausnahme von einem alle älter als ein Jahr waren, und fand bei allen diesen Kindern erhöhte AFP-Werte. Diese lagen in einem Bereich von 56 - 8825 ng/ml. Für gesunde Kinder hingegen bzw. Kindern mit Bronchiektasen und gluteninduzierter Malabsorption, die als Kontrollgruppe dienten, bestimmten sie Werte zwischen 5 und 25 ng/ml. Mäßig, aber signifikant erhöhte AFP-Werte fand diese Arbeitsgruppe auch bei den Eltern dieser Kinder und bei 50 % der Geschwister (Bereich 25 - 568 ng/ml bzw. 6 - 400 ng/ml).

Aufgrund dieser Ergebnisse hielten Chandra und Mitarbeiter die AFP-Bestimmung im Serum für einen guten Suchtest, um ausser den manifest erkrankten Kindern auch noch die heterozygoten Erbträger zu ermitteln.

Durch diese Mitteilung angeregt, wurden hier von 12 Mukoviszidose-Patienten, die in der Klinik ständig in ambulanter Behandlung stehen, die AFP-Werte im Serum bestimmt. Die gefundenen Werte lagen zwischen 0,3 und 8,2 ng/ml (Mittelwert 2,56), wobei die Werte von 2 Kindern mit 8,2 und 6,4 ng/ml oberhalb des Normalbereichs lagen (Abb. 27). Die Leberenzymwerte lagen bei allen untersuchten Kindern zum Zeitpunkt der Durchführung der AFP-Bestimmungen im Normbereich.

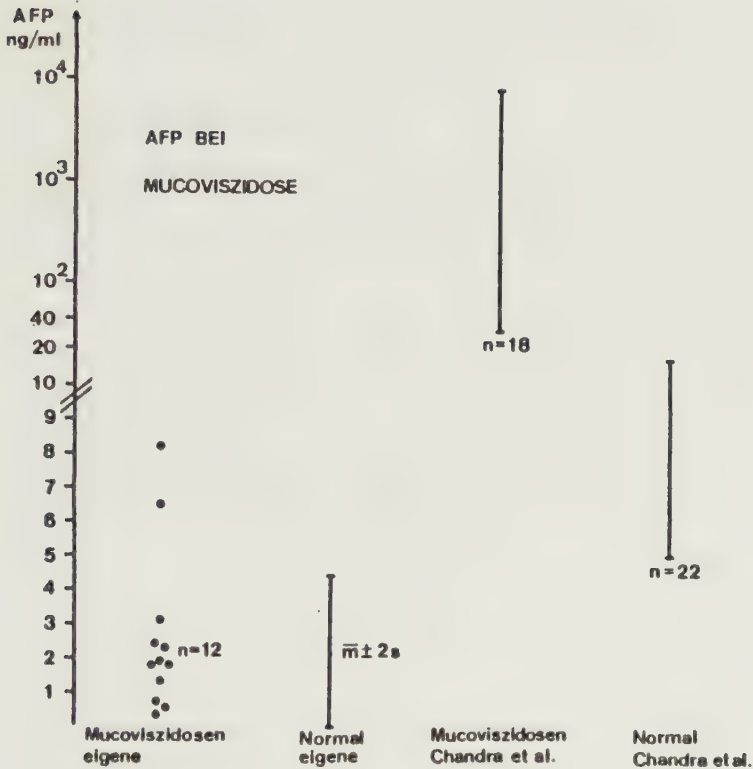


Abb. 27

Vergleich der AFP-Werte von Kindern mit Mukoviszidose und gesunden Kindern mit den Literaturwerten

4.) Patienten mit Turner Syndrom

Erhöhte AFP-Werte wurden bei einigen kindlichen Erkrankungen beschrieben, die auf einem genetischen Defekt beruhen (bei der Ataxia teleangiectatica (206, 228, 229), Tyrosinose (26, 27, 46), Mukoviszidose (50, 208) und Indischer Kinderzirrhose (48, 155) sowie einmal beim Down Syndrom (6)).

Um das Spektrum der AFP-Bestimmungen bei Erkrankungen mit zugrunde liegendem genetischen Defekt noch zu erweitern, wurden bei 10 Kindern mit Turner Syndrom die AFP-Werte im Serum bestimmt. Von 3 Kindern wurden die Werte sowohl vor, als auch während einer Oxandrolontherapie bestimmt, von den 7 übrigen nur unter dieser Therapie. 2 dieser 3 Kinder zeigten vor der Therapie erhöhte Werte von 6,3 bzw. 9,2 ng/ml, letzter Wert fiel unter Therapie in den Normalbereich ab auf 2,7 ng/ml. Alle übrigen Kinder zeigten normale Werte, unter diesen befanden sich zwei, bei denen ein XO/XX-Mosaik vorlag.

5.) Patienten unter hochdosierter Sexualhormontherapie

Will man einen möglichen Einfluss von Sexualhormonen auf die AFP-Produktion diskutieren, so sind drei verschiedene Mechanismen denkbar:

1. Unter der Östrogenwirkung könnte die Leberzelle wieder zur Produktion eines spezifischen Östrogen-bindenden-Proteins angeregt werden, wobei unter den z. Z. bekannten Proteinen AFP die höchste Affinität zu Östrogenen besitzt (88, 166, 220, 222).
2. Im Rahmen der durch Sexualhormone hervorgerufenen Veränderungen des Lebermetabolismus (23) könnte es auch zu einer Änderung der AFP-Syntheserate kommen.
3. Da die Erwachsenenleber nur eine geringe Syntheserate für AFP aufweist, könnten die ungebundenen hohen Hormonspiegel zu einer verstärkten Proliferation der Hepatozyten, und somit zur vermehrten Bildung von benignen, vielleicht aber auch malignen Hepatomen, führen (88), welche ihrerseits dann möglicherweise AFP produzieren könnten. Ob solche Tumoren unter der Einnahme von z. B. Kontrazeptiva wirklich häufiger auftreten, ist Gegenstand lebhafter Diskussionen (22, 35, 40, 47, 52, 57, 62, 68, 70, 89, 101, 111, 136, 150, 215).

Um einen eventuellen Einfluss von exogen zugeführten Sexualhormonen auf die AFP-Synthese zu erfassen, wurde ein Kollektiv von 7 Kindern gewählt. Es handelte sich um 6 Mädchen und einen Jungen. Das Alter lag zwischen 12 und 16 Jahren, mit einem Mittelwert von 13,5 Jahren. Diese wurden zur Beeinflussung des Hochwuchses mit sehr viel höheren Hormondosen behandelt,

als sie zum Zwecke der Ovulationshemmung benötigt werden. Bei diesen Kindern war somit am ehesten durch die höhere Dosierung und die noch empfindlicher reagierende kindliche Leber ein Einfluss auf die AFP-Synthese zu erwarten.

Bei den Mädchen wurde eine Therapie mit konjugierten Östrogen (Presomen^R) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein Präparat, das als Hauptbestandteile Östronsulfat (durchschnittlich 51 %), Equilinsulfat (22 %), Dihydroequilinsulfat (16 %) und 17 -Östradiolsulfat (6,4 %) enthält. Die Tagesdosis betrug 6 Tabletten = 7,5 mg. Die Östrogene wurden ohne Unterbrechung verabreicht. Zusätzlich erhielten die Mädchen jede 4. Woche 5 Tage lang ein orales Gestagen (Primolut-Nor^R). Der Junge erhielt ein Testosteron-Präparat (Testoviron Depot 500 mg/14 Tagen). Bei all diesen Kindern wurden normale AFP-Werte im Serum gefunden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe des AFP-Spiegels zwischen den vor Therapiebeginn und den unter der Therapie bestimmten Werten.

6.) Patienten mit Spina bifida

Auf die Bedeutung pathologisch erhöhter AFP-Spiegel während der Schwangerschaft im Hinblick auf ZNS Missbildungen wurde bereits hingewiesen (40, 41, 42, 73, 83, 195).

Als Ursache für die AFP-Erhöhung bei Spina bifida aperta wird ein schneller Übertritt des Proteins vom Feten durch die offene Neuralleiste ins Fruchtwasser und das mütterliche Serum diskutiert (195).

Bei 22 Patienten mit diesem Krankheitsbild wurden in einem späteren Lebensalter die AFP-Werte im Serum bestimmt. Dies waren 11 Jungen und 11 Mädchen im Alter von 2 1/2 bis 17 Jahren. Die gefundenen Werte streuten in einem Bereich von 0,8 bis 5,3 ng AFP/ml, der Mittelwert betrug 2,5 ng/ml. Bis auf einen Wert lagen alle unter 4 ng und damit im Normbereich.



C.) DISKUSSION

I.) BEWERTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1.) Diskussion der labortechnischen Resultate

Bei dem labortechnisch näher untersuchten RIA der Firma Behringwerke wurden zufriedenstellende Ergebnisse in bezug auf Praktikabilität, Trennschärfe, Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Richtigkeit gefunden. Für die letztgenannten Größen gelten hierbei jedoch die mittels Verdünnungstest herausgearbeiteten Einschränkungen. Danach sind besonders die AFP-Analysen in Seren mit sehr hoher AFP-Konzentration mit einem grossen Fehler behaftet, wenn der Bestimmungsbereich nicht in den idealen Messbereich des RIA's fällt. Dies gilt insbesondere für die verdünnten Kits. Messwerte, die im verdünnten Kit das Ergebnis von max. 60 ng übersteigen bzw. im unverdünnten Kit nicht in den Bereich zwischen 70 und 280 ng fallen, sollten in entsprechender Verdünnung nochmals bestimmt werden. Dies gilt insbesondere für Resultate, bei denen es sich in diagnostischer Hinsicht um Grenzwerte handelt. Es soll jedoch nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die im Verdünnungstest aufgezeigten Fehler nicht bei allen, sondern bei etwa der Hälfte der Seren auftraten, während für die anderen reproduzierbare Ergebnisse längs des gesamten Messbereichs der Standardkurve erhalten wurden.

Ruoslahti und Seppälä fanden in mehrfach eingefrorenen und aufgetauten Seren sowie in Seren mit hoher AFP-Konzentration zwei Formen von AFP mit unterschiedlichem Molekulargewicht von 70.000 und 140.000 (181). Auch andere Autoren wiesen auf AFP-Varianten und deren Wichtigkeit in einer radioimmunologischen Bestimmungsmethode hin (30, 174). Ob hierin jedoch ein Grund für die abweichenden Resultate zu suchen ist, oder ob diesen ein anderer

Eiweisseffekt zugrunde liegt, kann durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. In den hier untersuchten Seren wurden allerdings nach mehrfachem Gefrieren und Auftauen keine unterschiedlichen Messergebnisse gefunden. Es ist denkbar, daß sich bei sehr hohen Ag Konzentrationen Komplexe nicht nur der Art Ag_1Ak_1 , sondern auch Ag_xAk_1 bilden. Diese können dann fälschlicherweise in den Bestimmungsbereich des Kits fallen. Spaltet sich ein derartiger Komplex beim Verdünnen des Serums wieder auf, so erhält man einen Messwert, der zum Verdünnungsfaktor nicht in linearer Beziehung steht.

Die Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, daß ein Pipettierfehler von max. 20 % zu keiner Überproportionalgrossen Verfälschung der Ergebnisse führt. Ebenso führt eine Änderung der Messzeit in einem weiten Bereich zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen über die Beeinflussbarkeit der PEG-Fällung durch unterschiedliche Plasmaproteinkonzentrationen zeigten, daß auch unphysiologische Proteinverschiebungen zu keiner wesentlichen Beeinflussung der Fällungsmethode führen. Besondere Verhältnisse liegen bei Agammaglobulinämie und bei Krankheiten mit begleitender Paraproteinämie vor. Bei diesen Erkrankungen erhält man falsche Werte bei einer radioimmunologischen AFP-Bestimmung, bei der PEG zur Ausfällung des Immunkomplexes benutzt wird.

Will man AFP-Titer verschiedener Laboratorien miteinander vergleichen, so muß man wissen, mit welchem Testbesteck die radioimmunologischen Bestimmungen durchgeführt wurden, solange kein standardisiertes AFP-Präparat zur Qualitätskontrolle zur Verfügung steht. Bei Verwendung der Kits verschiedener Firmen sind die Ergebnisse entsprechend den aufgestellten Gleichungen zu korrigieren.

2.) Diskussion der physiologischen AFP-Konzentrationen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten radioimmunologischen AFP-Bestimmungen wurde in der Mehrzahl der Fälle die empfindlichere Analysenmethode (verdünnter Kit) benutzt. Bei Anwendung dieser Messmethode liegen die physiologischen AFP-Spiegel nach Vollendung des 2. Lebensjahres unter 4,5 ng/ml. Werten zwischen 4,5 ng und 8 ng/ml ist primär noch keine pathologische Bedeutung beizumessen, diese sollten jedoch kontrolliert und gegebenenfalls verfolgt werden. Werte über 8 ng/ml sind pathologisch erhöht, ihre Ursache muß daher abgeklärt werden.

Den physiologischen AFP-Werten wird eher ein logarithmisches Verteilungsmuster als eine Gaus'sche Verteilung gerecht. Zum Teil ist dies aus theoretischen Erwägungen schon zu fordern, da eine Trennung sehr kleiner AFP-Konzentrationen methodisch problematisch ist und für Werte unter 0,5 ng/ml nicht mehr besteht. Will man die Höhe des AFP-Spiegels bei einem früheren Lebensalter diagnostisch verwerten, muß man den angegebenen Normalbereich für Kinder bis zum 2. Lebensjahr für die Beurteilung der AFP-Werte zugrunde legen. Aufgrund der gefundenen Resultate erscheint es problematisch, die Höhe des AFP-Spiegels bei Neugeborenen zur Differentialdiagnose der Neonatalen Hepatitis und Gallengangs-Atresie heranzuziehen, wie dies von einigen Autoren vorgeschlagen wurde (96, 99, 232), da schon die Normalwerte bei Früh- und Neugeborenen um den von Zelter und Mitarbeitern angegebenen Grenzwert von 4 mg/100 ml (232) streuen.

Wie durch die AFP-Messungen im Serum von Frühgeborenen gezeigt wurde, findet ein Abfall des AFP mit grosser Wahrscheinlichkeit schon im fetalen Serum vor der Geburt statt. Die Höhe des AFP-Spiegels im Serum von Frühge-

borenen ist somit ein guter Index des auch mit anderen Methoden bestimm-
baren Gestationsalters, sie lässt jedoch keine direkten Rückschlüsse auf den
Reifegrad der Leber zu, wie durch den Vergleich mit den Bilirubinwerten im
Serum dieser Kinder gezeigt wurde.

3.) Diskussion der klinischen Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß eine Einführung der AFP-Bestimmung in die
Diagnostik entzündlicher Lebererkrankungen zur näheren Differenzierung des
histologischen Typs, des Schweregrades, einer HB_s Ag positiven oder nega-
tiven Form nicht geeignet ist, da sie keine zusätzlichen Informationen lie-
fert.

Die Nützlichkeit von AFP-Messungen im Serum von Patienten, die mit Zytosta-
tika therapiert werden, kann noch nicht abschliessend beurteilt werden.
Lehmann und andere Autoren (125, 133, 135, 170, 223) fanden transitorische
AFP-Erhöhungen in prospektiven Studien bei Patienten mit Leberzirrhose. Sie
diskutierten das Ergebnis als ersten Ausdruck eines sich später manifestie-
renden Leberzellkarzinoms. Ob die bei einigen Patienten im Serum gefundenen
geringfügigen AFP-Erhöhungen während der Therapie mit Zytostatika in ana-
loger Weise zu deuten sind, kann durch die vorgenommenen Untersuchungen
nicht beurteilt werden. Diese Frage könnte nur durch prospektive Untersu-
chungen geklärt werden, es erscheint jedoch als wenig wahrscheinlich.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse kann gesagt werden, daß durch eine
AFP-Bestimmung eine Mukoviszidose nicht diagnostiziert werden kann. Erst
recht lassen sich damit keine heterozygoten Erbträger dieser Erkrankung er-
kennen, wie dies von Chandra und Smith propagiert wurde (50, 208). Die Er-

gebnisse stimmen in dieser Hinsicht mit neueren Literaturangaben überein (112, 113).

Kinder mit Turner Syndrom zeigten in der Regel keine erhöhten AFP-Spiegel, wie dies bei anderen genetischen Leiden der Fall sein soll. Auch im Serum von Kindern, die mit hohen Dosen von Sexualhormonen therapiert wurden, wurden normale AFP-Konzentrationen gefunden. Ob regelmässige AFP-Kontrollen im Serum solcher Kinder sinnvoll sind, ist nur in Verbindung mit der noch nicht abgeschlossenen Diskussion über eine potentielle Induktion maligner Tumoren durch eine langfristige und hohe Hormontherapie zu beantworten und dann ähnlich zu sehen, wie die Durchführung von regelmässigen AFP-Kontrollen bei Patienten mit einer Zytostatikatherapie. Jedoch erscheint eine Bedeutung solcher Kontrollen eher unwahrscheinlich.

Die untersuchten Kinder mit Spina bifida zeigten erwartungsgemäss normale AFP-Spiegel.

II.) ZUSAMMENFASSUNG

Die radioimmunologische AFP-Bestimmung mittels fertiger im Handel erhältlicher Testbestecke verschiedener Firmen ist eine im radiologischen Labor relativ einfach durchzuführende Methode. AFP-Bestimmungen während der Schwangerschaft sowie zur Diagnose maligner Leberzellkarzinome und teratogenetischer Tumoren haben heute einen festen diagnostischen Platz.

Die von Firmen erhältlichen fertigen Testbestecke zum AFP-Nachweis erwiesen sich unter praktischen Laboratoriumsbedingungen als sehr gut handhabbar und wenig stör anfällig. Bei deren Verwendung sind jedoch gewisse in dieser Arbeit aufgezeigte Fehlermöglichkeiten im Auge zu behalten.

Auch im Blut gesunder Kinder bleibt über das 2. Lebensjahr hinaus noch eine geringe AFP-Menge nachweisbar. Bis zum 2. Lebensjahr zeigen sich auch normalerweise über diesen späteren Basiswert hinaus erhöhte Konzentrationen, die im wesentlichen dann altersabhängig sind.

Neben den schon bekannten Einsatzgebieten der AFP-Bestimmung ergaben sich durch die Untersuchungen an verschiedenen Patientenkollektiven keine neuen Indikationsbereiche. Jedoch zeigte die Bestimmung des AFP-Spiegels bei Kindern unter zytostatischer Therapie einige interessante Aspekte. Die Ergebnisse der Autoren, die den Einsatz von AFP-Messungen zur Diagnose bei der Mukoviszidose nahelegten, konnten nicht bestätigt werden.

Erklärung der Abkürzungen

AFP	Alpha-Fetoprotein
Ag	Antigen
Ag ^x	radioaktiv markiertes Antigen
AH	akute Hepatitis
Ak	Antikörper
As	Aminosäure
C ¹⁴	Kohlenstoff Isotop 14
CAH	chronisch aggressive Hepatitis
CPH	chronisch persistierende Hepatitis
EDTA	Ethylendiamintetraacid, Äthylendiamintetraessigsäure
HCG	human-chorionic-gonadotropine
HCL	Salzsäure
HwZ	Halbwertszeit
J	Jod
J ¹²⁵ , 125-J	Jod Isotop 125
Imp, cpm	Impulses per minute, counts per minute
Na ₂ HPD ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
PEG	Polyethylenglycol, Polyäthylenglykol
PVAH	protrahierter Verlauf einer akuten Hepatitis
RIA	Radiommunassay
SSW	Schwangerschaftswoche

Die zur Bezeichnung von Medikamenten benutzten Abkürzungen sind im Text angegeben.

D.) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1.) Abelev, G. I.: Production of embryonal serum γ -globulin by hepatomas: Review of experimental and clinical data. Cancer Res. 28, 1344 (1968)
- 2.) Abelev, G. I.: AFP production by normal liver and liver tumors. In Peeters, H. (ed.) Protides of biological fluids, 18, 203 Oxford: Pergamon Press 1971
- 3.) Abelev, G. I.: AFP in ontogenesis and its association with malignant tumors. Advanc. Cancer Res. 14 295 (1971)
- 4.) Abelev, G. I.: Regulation of AFP synthesis. Neoplasma 20 563 (1973)
- 5.) Abelev, G. I., Perova, S. D., Khramkova, N. I., Postnikova, Z. A., Irlin, I. S.: Production of embryonal γ -globulin by transplantable mouse hepatomas. Transplant. 1, 174 (1963)
- 6.) Adinolfi, M., Gardner, B., Martin, W.: Fetal proteins and immunoglobulins. Atti.Ass.Genet.ital. 12 133 (1967)
- 7.) Akai, S., Kato, K.: Serum AFP positive stomach cancer. Gann Monogr. Cancer Res. 14 149 (1973)
- 8.) Akdamar, K., Maumus, L. T., Cherric, A. L., Font, R.G., Sparks, R.D.: Serum AFP, immunoglobulins (IgG:IgM:IgA) and hepatitis induced antigen in patients with liver disease in the New Orleans area. Gastroenterology 60 759 (1971)
- 9.) Allan, L. D.: Amniotic-Fluid AFP in the antenatal diagnosis of spina bifida. Lancet II, 522 (1973)
- 10.) Alpert, E.: AFP: Serologic marker of human hepatoma and embryonal carcinoma. Nat.Cancer Inst. Monogr. 35 415 (1972)

- 11.) Alpert, E. , Zuckermann, J.: Absence of AFP antigen or antibody in maternal sera. *Lancet* II 465 (1970)
- 12.) Alpert, E.: AFP: Need for quantitative assays. *New. Engl. J. Med.* 290 568 (1974)
- 13.) Alpert, E. , Drysdale, J. W. , Isselbacher, K. J. , Schur, P. H.: Human AFP: Isolation, characterization and demonstration of microheterogeneity. *J. biol. Chem.* 247 3792 (1972)
- 14.) Alpert, E. , Coston, R. , Perrotto, J.: Immuno enzymatic assay for AFP. *Lancet* I 626 (1974)
- 15.) Alpert, E. , Coston, R. L. , Cahill, J. F. , Cohen, H.: Evalution of a rapid latex-agglutination test for the detection of AFP. *Tumor Res.* 8 47 (1973)
- 16.) Alpert, E. , Hersberg, R. , Schur, P. H. , Isselbacher, K. J.: AFP in hepatoma: improved detection in serum and quantitative studies using a new sensitive technique. *Gastroenterology* 61 137 (1971)
- 17.) Alpert, E. , Drysdale, J. W. , Isselbacher, K. J.: Isoelectric focusing of human AFP: an aid in purification and characterization of microheterogeneity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 209 387 (1973)
- 18.) Andrieu, J. , Breart, G. , Rodier, B. , Robert, P. E.: A propos de l'existence de l'alpha-1-fœtoprotéine en dehors de l'hépatome. *Presse méd.* 79 1595 (1971)
- 19.) Aterman, K.: Neonatal hepatitis and its relation to viral hepatitis of mother. *American J. Dis. Children* 105 395 (1963)
- 20.) Bagshawe, A. , Parker, A. M.: Age-distribution of AFP in hepatocellular carcinoma. *Lancet* II 268 (1970)
- 21.) Ballas, M.:Yolk sac carcinoma of the ovary with AFP in serum and ascitic fluid. *Amer. J. clin. Path.* 57 511 (1972)

- 22.) Baum, J. K., Bookstein, J. J., Holtz, F., Klein, E. W.: Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. *Lancet* II 926 (1973)
- 23.) Beaconsfield, P.: Liver tumors and steroid hormones. *Lancet* I 516 (1974)
- 24.) Becker, F. F.: A study of alpha-1-fetoprotein levels during exposure to 3-methyl-e-dimethylaminoazobenzene and its analogs. *Cancer Res.* 35, 1510 (1975)
- 25.) Becker, F. F., Sell, S.: Early elevation of AFP in N-2-flourenyl-acetamide hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 34 2489 (1974)
- 26.) Bélanger, L., Bélanger, M., Larochelle, J.: Une cirrhose infantile associée à la néoproduction d'alpha-foetoprotéine. Perspectives nouvelles dans la tyrosinémie héréditaire. *Nouv. Presse méd.* 1 1503 (1972)
- 27.) Bélanger, L., Bélanger, M., Prive, L., Larochelle, J., Tremblay, M. Tyrosinémie héréditaire et alpha-1-foetoprotéine. 1. Intérêt clinique de l'alpha-foetoprotéine dans la tyrosinémie héréditaire. *Path. et. Biol.* 21 449 (1973)
- 28.) Bélanger, L., Hamel, D., Lachance, L., Dufour, D., Tremblay, M., Gagnon, P. M. : Hormonal regulation of AFP. *Nature* 256 657 (1975)
- 29.) Bélanger, L., Sylvestre, C., Dufour, D.: Enzyme-linked immunoassay for AFP by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* 48 15 (1973)
- 30.) Benassayag, C., Vallette, G., Cittanova, N., Nunez, E., Jayle, M. F. : Isolation of two forms of rat AFP and comparison of their binding parameters with estradiol-17 β . *Biochimica et Biophysica acta* 412 295 (1975)

- 31.) Bergstrand, C. G. , Czar, B.: Paper electrophoresis study of human fetal serum protein with demonstration of a new protein fraction. Scand. J. clin. Lab. Invest. 9 277 (1956)
- 32.) Bergstrand, C. G. , Czar, B.: Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus. Scand. J. clin. Lab. Invest. 8 174 (1956)
- 33.) Bergstrand, C. G. , Karlsson, B. W. , Lindberg, T. , Ekelung, H.: AFP, Albumin and total protein in serum from preterm and term infants and small-for-gestational age infants. Acta paediat. (Uppsala) 61 128 (1972)
- 34.) Berkel, A. I.: Serum AFP in childhood. Turk. J. Pediatr. 15 171 (1973)
- 35.) Bhagwat, A. G.: Liver tumours and steroid hormones. Lancet I 171 (1974)
- 36.) Bloomer, J. R. , Waldmann, T. A. , McIntire, K. R. , Klatskin, G. : Serum AFP levels in patients with non-neoplastic liver disease. (24th Ann. Meeting, Ann. Assoc. Study Liver Dis. Chicago, USA, 1973) Gastroenterology 65 Nr. 3 (1973)
- 37.) Borel-Giraud, N. , Berthet, P. , Nyssen, M. , Dorche, J. , Girard, M. , Bel, A. , Vachon, A. , Plauchu, M. , Saint Cyr, M.: La recherche et le dosage de l'alpha-foeto-protéine dans le sérum humain. Nouv. Presse méd. 4 27 (1975)
- 38.) Bourgeaux, C. , Martin, F. , Aupecle, P. , Guerrin, J.: Valeur pratique de l'alpha-foetoprotéine dans le diagnostic et la surveillance post-opératoire des tumeurs embryonnaires du testicule. Presse méd. 79 1589 (1971)

- 39.) Branch, W. R.: The ontogeny of AFP in the foetal and neonatal rabbit, and its experimental induction in adult rabbits. Int. J. Cancer 10 451 (1972)
- 40.) Brock, D. J. H., Bolton, A. E., Monaghan, J. M.: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-AFP measurement. Lancet II 923 (1973)
- 41.) Brock, D. J. H., Scrimgeour, J. B.: AFP in the prenatal diagnosis of CNS malformations. Lancet I 569 (1974)
- 42.) Brock, D. J. H., Sutcliffe, R. G.: AFP in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet II 197 (1972)
- 43.) Brock, N., Schneider, B.: Zur Frage der carcinogenen Wirkung von Krebs-Chemotherapeutika und chem. Immunsuppressiva. Arzneimittel-Forsch. 21 435 (1971)
- 44.) Buffe, D.: Fetoproteins and children's tumors. Gann, Monogr. Cancer Res. 14 117 (1973)
- 45.) Buffe, D., Rimbaut, C.: L-alpha-1-fetoprotéine dans les atteints hépatiques et les maladies métaboliques de l'enfant. Biomed. 19 172 (1973)
- 46.) Burkert, H.: Chemotherapie maligner Tumoren. Krebs: Praxis seiner Diagnose und Therapie. (Hrsg. Weidner, K. Hippokrates Verlag Stuttgart. 1974 S. 48)
- 47.) Cattani, D., Vesin, P., Wautier, J., Kalifat, R., Meignan, S.: Liver tumours and steroid hormones. Lancet I 878 (1974)
- 48.) Chandra, R. K.: Indian childhood cirrhosis: clinical, biochemical, genealogical, histomorphological and immunological observations. Med. Chir. Dig. 3 63 (1974)

- 49.) Chandra, R. K.: Hepatitis antigen and AFP in neonatal hepatitis.
Arch. Dis. Child. 48 157 (1973)
- 50.) Chandra, R. K., Madhavankutty, K., Way, R. C.: Serum AFP levels in patients with cystic fibrosis and their parents and siblings.
Brit. med. J. I 714 (1975)
- 51.) Chayvialle, J. A. P., Ganguli, P. C.: Radioimmunoassay of AFP in human plasma. Lancet I 1355 (1973)
- 52.) Christopherson, W. M., Truman Mays, E., Barrows, G. H.:
Liver tumors in women on contraceptive steroids. Obstet. Gynec. 46 221 (1975)
- 53.) Clark, J. V.: Assessment of foetal and cord blood, amniotic fluid and hepatoma patients' blood for three foetal antigens.
Prot. biol. fluids 18 235 (1971)
- 54.) Dahl, M. G. C., Gregory, M. M., Scheuer, P. J.: Liver damage due to Methotrexate in patients with psoriasis. Brit. Med. J. 1 625 (1971)
- 55.) Dattwyler, R. J., Murgita, R. A., Tomasi, Jr T. B.: Binding of AFP to murine T-cells. Nature 256 656 (1975)
- 56.) Dattwyler, R. J., Tomasi, T. D.: Inhibition of sensitization of T-cells by AFP. Int. J. Cancer 16 942 (1975)
- 57.) Davies, J. N. P.: Liver tumors and steroid hormones. Lancet I 516 (1974)
- 58.) Deckers, C., Deckers-Passau, L.: AFP, α_2 globulin and B-globulin in various rat tumours. Prot. biol. fluids. 18 251 (1971)
- 59.) Delbrück, H., Schaison, G., Chelloul, N., Bernard, J.:
Leberkarzinom bei einem Kind nach siebenjähriger kompletter Remission einer akuten Lymphoblastenleukämie. Dt. Med. Wschr. 100 1792 (1975)

- 60.) Delmont, J., Kermarec, C. J., Lafont, J., Bonet, C., Cassuto, J. P., Masseyeff, R.: Radioimmunoassay of AFP: II. Studies in patients suffering from hepatic diseases. Digestion 10 29 (1974)
- 61.) Desser-Wiest, L.: Die Regulation der Zellvermehrung und der Zellenerneuerung in der Leber von Säugetieren durch Corticosteron und AFP. Wien. klin. Wschr. 86 390 (1974)
- 62.) Döller, W.: Steroidhormone und Lebertumoren. Internist 16 131 (1975)
- 63.) Economopoulos, P., Theodoropoulos, G., Sakellaropoulos, N.: AFP in Greece and France. Lancet I 1337 (1970)
- 64.) Elgort, D. A., Abelev, G. I.: Immunoautoradiographic determination of AFP in animals and man. Bull. exp. Biol. Med. 2 118 (1971)
- 65.) Elgort, D. A., Abelev, G. I., Levina, D. M., Marienbach, E. V., Martochkina, G. A.: Immunradioautography test for AFP in the differential diagnosis of germiogenic tumors of the testis and in the evaluation of effectiveness of their treatment. Int. J. Cancer 11 586 (1973)
- 66.) Elgort, D. A., Abelev, G. I., O'Connor, G. T.: Dependence of the specificity of the serologic test for primary liver cancer in different areas of the world on sensitivity of the method used for detecting AFP. Int. J. Cancer 10 331 (1972)
- 67.) Finkelstein, J. Z., Higgins, G. R., Faust, J., Karon, M.: Serum AFP and malignancy in children. Cancer (Philad.) 30 80 (1970)
- 68.) Finnström, O., Karlsson, B., Zetterlund, B.: Studies on maturity in newborn infants. VIII: AFP and albumin. Acta Paediatr. Scand. 64 409 (1975)
- 69.) Foy, H., Kondi, A., Linsell, C. A., Parker, A. M., Sizaret, P.: Positive AFP tests in pyridoxine deprived baboons: relevance to liver carcinoma in Africans. Nature 225 952 (1970)

- 70.) Foy, H. , Kondi, A. , Parker, A. M. , Stanley, R. ; Venning, C. D.:
The AFP test in pregnant women on oral contraceptives, newborn
babies and pyridoxine-deprived baboons. *Lancet* I 1336 (1970)
- 71.) Franchimont, P. , Zangerle, P. F. , Debruche, M. L. , Proyard, J. ,
Simon, M. , Gaspard, U.: Dosage radio-immunologique de l'alpha-
foeto-protéine dans différentes conditions normales et pathologiques.
Annales de biologie clinique 33 139 (1975)
- 72.) Gajdos, A. , :L-alpha-foetoprotéine. *Nouv. Presse méd.* 2 987
(1973)
- 73.) Gassner, M. , Grob, P. J.: AFP-diagnostische Bedeutung *Schweiz.*
med. Wschr. 104 557 (1974)
- 74.) Gitlin, D.: Normal biology of AFP. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 259 7
(1975)
- 75.) Gitlin, D. , Boesman, M.: Sites of serum AFP synthesis in the human
and in the rat. *J. clin. Invest.* 46 1010 (1967)
- 76.) Gitlin, D. , Perricelli, A. , Gitlin, G.: Synthesis of AFP by liver,
yolk sac and gastrointestinal tract of the human conceptus. *Cancer*
Res. 32 979 (1972)
- 77.) Synthesis of serum albumin, praalbumin, AFP, α_1 -Antitrypsin and
transferrin by the human yolk sac. *Nature* 228 995 (1970)
- 78.) Goussev, A. I. , Engelhardt, N. V. , Masseyeff, R. , Camain, R. , Basteris,
B.: Immunofluorescent study of AFP in liver and liver tumours.
II. Localisation of AFP in the tissues of patients with primary
liver cancer (PLC). *Int. J. Cancer* 7 207 (1971)
- 79.) Grabar, P.: Introductory remarks on foetal proteins and their re-
appearance in tumors. *Prot. biol. fluids* 18 201 (1971)

- 80.) Grunst, J., Fateh, A., Lamerz, R., Grundmann, R.: Stoffwechseler-
änderungen nach partieller Hepatektomie beim Menschen. Ges. Inn.
Med. 82 297 (1976)
- 81.) Gutjahr, P.: Therapie maligner Tumoren im Kindesalter.
Therapie der Gegenwart 116 28 (1977)
- 82.) Gutjahr, P., Spranger, J.: Acute leukemia following anticancer
treatment. J. Pediat. 87 1004 (1975)
- 83.) Harris, R.: Comparison of amniotic-fluid and maternal serum AFP levels
in the early antenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly.
Lancet I 429 (1974)
- 84.) Hasegawa, H., Mukojima, T., Hattori, M., Sano, R., Hirota, T.:
Embryonal carcinoma and AFP with special reference to hepatoblastoma.
Gann, Monogr. Cancer Res. 14 129 (1973)
- 85.) Hirai, H., Nishi, S., Watabe, H., Tsukada, Y.: Some chemical, expe-
rimental and clinical investigations of AFP.
Gann, Monogr. Cancer Res. 14 19 (1973)
- 86.) Hirai, H., Nishi, S., Watabe, H.: Radioimmunoassay of AFP.
J. nucl. Med. 13 783 (1973)
- 87.) Hirai, H., Nishi, S., Watabe, H.: Chemical studies of AFP's of human
and several other animals. Tumor Res. 8 11 (1973)
- 88.) Hooghe, R.: Benign hepatomas and oral contraceptives. Lancet I
630 (1974)
- 89.) Horvath, E., Kovacs, K., Ross, R. C.: Benign hepatoma in a young woman
on contraceptive steroids. Lancet I 357 (1974)
- 90.) Ishii, M.: Radioimmunoassay of AFP. Gann, Monogr. Cancer Res. 14 89
(1973)

- 91.) Ishiguro, T.: AFP in twin pregnancy. Lancet II 1214 (1973)
- 92.) Itoh, T., Shirai, T., Naka, A., Matamoto, S.: Yolk sac tumor and AFP: clinicopathological study of four cases. Gann. 65 215 (1974)
- 93.) Kanai, K., Endo, Y., Oda, T., Kaneko, Y.: Synthesis of AFP by rat ascites hepatoma cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 29 (1975)
- 94.) Kahan, B., Levine, L.: The occurrence of a serum fetal alpha-1-protein in developing mice and murine hepatomas and teratomas. Cancer Res. 31 930 (1971)
- 95.) Kang, K. Y., Higashino, K., Takahashi, Y., Hashinotsume, M., Yamamura, Y.: AFP in infantile diseases. Clin. chim. Acta 42 175 (1972)
- 96.) Kang, K. Y., Higashino, K., Takahashi, Y., Hashinotsume, M.: AFP in ill infants. New Engl. J. Med. 287 48 (1972)
- 97.) Karlsson, B. W., Bergstrand, C. G., Ekelund, H., Lindberg, T.: Postnatal changes of AFP, albumin and total protein in human serum. Acta paediat. 61 133 (1972)
- 98.) Karvountzis, G. G., Redeker, A. G.: Relation of AFP in acute hepatitis to severity and prognosis. Ann. intern. Med. 80 156 (1974)
- 99.) Kattamis, C. A., Laskari, S., Matsaniotis, N. S.: Differentiation between neonatal hepatitis and biliary atresia by measuring serum AFP. Lancet II 650 (1974)
- 100.) Kekomäki, M., Seppälä, M., Ehnholm, C., Schwartz, A. L., Raivio, K.: Perfusion of isolated human fetal liver: synthesis and release of AFP and albumin. Int. J. Cancer 8 250 (1971)
- 101.) Kelo, D. R.: Benign hepatomas and oral contraceptives. Lancet I 315 (1974)
- 102.) Kew, M. C.: AFP in primary liver cancer and other diseases. Gut 15 814 (1974)

- 103.) Kew, M. C., Geddes, E. W., Macnab, G. M., Bersohn, I.: Hepatitis-B-antigen and cirrhosis in Bantu patients with primary liver cancer. *Cancer* 34 539 (1974)
- 104.) Kew, M. C., Purves, L. R., Bersohn, I.: Serum AFP levels in acute viral hepatitis. *Gut* 14 939 (1973)
- 105.) Kew, M. C., Dos Santos, H. A., Sherlock, S.: Diagnosis of primary cancer of the liver. *Brit. med. J.* IV 408 (1971)
- 106.) Kitagawa, T., Yokochi, T., Sugano, H.: AFP and hepatocarcinogenesis in rats. *Gann, Monogr. Cancer Res.* 14 249 (1973)
- 107.) Kitagawa, T., Yokochi, T., Sugano, H.: AFP and hepatocarcinogenesis in rats fed 3'-methyl-4-(dimethyl-amino) azobenzene or N-2-fluorenylacetamide. *Int. J. Cancer* 10 368 (1972)
- 108.) Kitaoka, H., Hattori, N., Mukojima, T., Ohkura, H., Nakayama, N., Okada, H.: AFP content in tissues from patients with gastric cancer. *Tumor Res.* 8 171 (1973)
- 109.) Kithier, K., Lusher, J., Brought, J., Poulik, M.: Effect of therapy on the serum level of alpha-1-fetoprotein in embryonal cell carcinoma. *J. Pediat.* 81 71 (1972)
- 110.) Kjessler, B., Sherman, M., Johanson, S. G. O., Gustavson, K. H., Hultquist, G.: AFP in antenatal diagnosis of congenital nephrosis. *Lancet* I 432 (1975)
- 111.) Knapp, W. A., Ruebner, B.H.: Hepatomas and oral contraceptives. *Lancet* I 270 (1974)
- 112.) Knöpfle, G., Becker, M., Rotthauwe, H. W.: Alpha-1-Fetoprotein: Physiologie, Pathologie und diagnostische Bedeutung mit besonderer Berücksichtigung des Kindesalters. *Klin. Pädiat.* 189 207 (1977)

- 113.) Knöpfel, G., Rotthauwe, H. W., Lehmann, F. G.: Serum AFP in cystic fibrosis. Brit. med. J IV 459 (1975)
- 114.) Kresno, S. B., Gandasoebrata, R., Rümke, P.: Serum AFP in Indonesia. Lancet I 1178 (1970)
- 115.) Kresno, S. B., Gandasoebrata, R., Rümke, P.: Serum AFP in patients with hepatoma from Djakarta. Prot. biol. Fluids 18 243 (1971)
- 116.) Kuroyangi, Y., :Results in the treatment of hepatocellular carcinoma with special reference to AFP. Gann, Monogr. Cancer Res. 14 107 (1973)
- 117.) Lamerz, R., Fateh-Moghandam, A.: Carcinofetale Antigene: I. AFP. Klin. Wschr. 53 147 (1975)
- 118.) Lamerz, R., Grunst, J., Fateh-Moghandam, A., Schmalhorst, U., Pichlmaier, H., Eisenburg, J.: Serum-AFP-Veränderungen nach partieller Hepatektomie am Menschen. Klin. Wschr. 53 129 (1975)
- 119.) Leek, A. E.: Origin of AFP. Lancet II 1088 (1974)
- 120.) Lehmann, F. G., Lehmann, D.: Alpha-1-Fetoprotein in malignen Tumoren. Klin. Wschr. 52 222 (1974)
- 121.) Lehmann, F. G.: Kristallisation von alpha-1-Fetoprotein aus dem Plasma eines Patienten mit primärem Lebercarcinom. Klin. Wschr. 49 609 (1971)
- 122.) Lehmann, F. G.: Der Nachweis von alpha-1-Fetoprotein bei internen Erkrankungen - aktueller Stand des Problems. Internist 13 332 (1972)
- 123.) Lehmann, F. G.: Tumorentigene. Dt. Med. Wschr. 99 410 (1974)
- 124.) Lehmann, F. G.: Serologische Tumordiagnostik. Internist 16 214 (1975)
- 125.) Lehmann, F. G.: Early detection of hepatoma: prospective study in liver cirrhosis using passive haemagglutination and radioimmunoassay. Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 196 (1975)

- 126.) Lehmann, F. G., Lehmann, D.: Isolierung und Kristallisation von alpha-1-Fetoprotein aus einem primären Leberzellkarzinom.
Z. klin. Chem. 9 309 (1971)
- 127.) Lehmann, F. G., Lehmann, D.: Neue immunologische Techniken und quantitative Bestimmung von alpha-1-Fetoprotein in der Tumordiagnostik.
Verh. dtach. Ges. inn. Med. 78 841 (1972)
- 128.) Lehmann, F. G., Lehmann, D.: Vergleich verschiedener Methoden zum serologischen Nachweis von alpha-1-Fetoprotein im Serum.
Z. klin. Chem. 11 339 (1973)
- 129.) Lehmann, F. G., Lehmann, D.: Alpha-1-Fetoprotein in malignen Tumoren.
Klin. Wschr. 52 222 (1974)
- 130.) Lehmann, F. G., Lehmann, D., Martini, G. A.: Reindarstellung, Kristallisation, biochemische Eigenschaften und klinische Bedeutung von alpha-1-Fetoprotein. Verh. dtach. Ges. inn. Med. 77 760 (1971)
- 131.) Lehmann, F. G., Lehmann, D., Martini, G. A.: Alpha-1-Fetoprotein. Isolierung und Kristallisation aus menschlichem Plasma.
Clin. chim. Acta 33 197 (1971)
- 132.) Lehmann, F. G., Lehmann, D., Martini, G. A.: Alpha-1-fetoprotein in liver diseases. Digestion 6 249 (1972)
- 133.) Lehmann, F. G., Lehmann, D., Martini, G. A.: Passive haemagglutination of alpha-1-fetoprotein: prospective study in liver cirrhosis.
Digestion 8 443 (1973)
- 134.) Lehmann, F. G., Lehmann, D., Martini, G. A.: Empfindlicher Nachweis für alpha-1-Fetoprotein im Serum durch passive Hämagglutination.
Klin. Wschr. 52 216 (1974)
- 135.) Lehmann, F. G., Martini, G. A.: Zur Häufigkeit hepatozellulärer Karzinome bei Leberzirrhose. Verh. dtach. Ges. inn. Med. 81 301 (1975)

- 136.) Lingeman, C. H.: Liver-cell neoplasms and oral contraceptives.
Lancet I 64 (1974)
- 137.) Marklein, G., Rings, M.: Quantitative immunologische Bestimmung des
alpha-1-Fetoprotein im Serum reifer und unreifer Neugeborener sowie
im Serum von Säuglingen und Kindern. Z. Kinderheilk. 113 327 (1972)
- 138.) Masopust, J., Kithier, K., Rádl, J., Koutecky, J., Kotál, L.:
Occurrence of AFP in patients with neoplasms and nonneoplastic diseases.
Int. J. Cancer 3 364 (1968)
- 139.) Masopust, J., Rádl, J., Houstek, J.: Occurrence of alpha-1-fetoprotein
in some infants suffering from hepatopathy.
Prot. biol. Fluids 18 239 (1971)
- 140.) Masopust, J., Zizkovsky, V., Kithier, K.: Fetoproteins in different
species of mammals. Prot. biol. Fluids 18 63 (1971)
- 141.) Masopust, J., Tomasova, H., Kotal, L.: Some physicochemical charac-
teristics of human alpha-1-fetoprotein. Prot. biol. Fluids 18 37 (1971)
- 142.) Masseyeff, R. F.: Factors influencing AFP biosynthesis in patients
with primary liver cancer and other diseases.
Gann, Monogr. Cancer Res. 14 3 (1973)
- 143.) Masseyeff, R., Basteris, B., Leblanc, L.: Use of the AFP test for the
diagnosis of primary liver cancer. Prot. biol. Fluids 18 217 (1971)
- 144.) Masseyeff, R., Bonet, G., Drouet, J.: Radioimmunoassay of AFP.
I. Technique and serum levels in the normal adult.
Digestion 10 17 (1974)
- 145.) Masseyeff, R., Gilli, J., Krebs, B., Bonet, G., Zrihen, H.: Radio-
immunoassay of AFP. V. Influence of age on the physiological serum AFP
level in man and in rat. Biomedicine (Express) 21 (8) 353 (1974)

- 146.) Masseyeff, R., Cassuto, J. P., Krebs, B. P., Audoly, P., Dujardin, P.:
AFP radioimmunoassay in blood diseases. N. Engl. J. Med. 291 532
(1974)
- 147.) Mawas, C., Buffe, D., Lemerle, J., Schweisguth, O., Burtin, P.:
Recherche immunologique de l'alpha-1-foeto-protéine ou fétuin dans
les tumeurs primitives du foie et les tératomes malins de l'enfant.
Arch. franc. Pediat. 26 779 (1969)
- 148.) Mawas, C., Buffe, D., Burtin, P.: Influence of age on AFP incidence.
Lancet I 1292 (1970)
- 149.) Mawas, C., Kohem, M., Lemerle, J., Buffe, D., Schweisguth, O., Burtin, P.:
Serum alpha-1-fetoprotein (fétuin) in children with malignant ovarian
and testicular teratomas - preliminary results. Int. J. Cancer 4 76
(1969)
- 150.) Mays, E. T., Christopherson, W. M., Barrows, G. H.: Focal nodular hy-
perplasia of the liver. Possible relationship to oral contraceptives.
Americ. J. clin. Path. 61 735 (1974)
- 151.) Meshkinpour, H.: AFP and alcoholic hepatitis. Am. J. Dig. Dis.
19 709 (1974)
- 152.) Moore, T., Dhar, P., Zamcheck, N., Keeley, A., Gottlieb, L., Kupchick, H.:
Carcinoembryonic antigens in liver disease. I. clinical and morpho-
logical studies. Gastroenterology 63 88 (1972)
- 153.) Mukojima, T., Hattori, N., Nakayama, N., Hasegawa, H., Ohkura, H.,
Kitaoka, H.: Elimination role of AFP after surgical operation and prog-
nosis of the patient with hepatoblastoma and hepatoma.
Tumor Res. 8 194 (1973)
- 154.) Mukojima, T., Ohkura, H., Hattori, N., Nakayama, N., Kitaoka, H.:
Routine procedures of alpha-1-fetoprotein titration by single radial

- immunodiffusion and by radioimmunoassay. *Tumor. Res.* 8 61 (1973)
- 155.) Nayak, N. C., Malaviya, A. N., Chawla, V., Chandra, R. K.: AFP in Indian childhood. *Lancet* I 68 (1972)
- 156.) Néchaud, B. de, Uriel, J.: Antigènes cellulaires transitoires du foie de rat. 3. Mode de réapparition de l'alpha-1-fœtoprotéine au cours l'hépatocarcinogénèse. *Int. J. Cancer* 11 104 (1973)
- 157.) Nishi, S.: Isolation and characterization of a fetal -globulin from sera of fetuses and a hepatoma patient. *Cancer Res.* 30 2507 (1970)
- 158.) Nishi, S., Hirai, H.: Purification and chemical characterization of human AFP. *Prot. Biol. Fluids* 18 43 (1971)
- 159.) Nishi, S., Hirai, H.: Hemagglutination test for AFP. *Tumor Res.* 8 51 (1973)
- 160.) Nishi, S., Hirai, H.: Radioimmunoassay of AFP in hepatoma, other liver diseases and pregnancy. *Gann, Monogr. Cancer Res.* 14 79 (1973)
- 161.) Nishioka, M., Iбата, T., Miyazota, K., Okita, K., Hironaga, K., Fujita, T.: Immunofluorescence studies on AFP in hepatoma tissue. *Gann, Monogr. Cancer Res.* 14 205 (1973)
- 162.) Nishioka, M., Iбата, T., Okita, K., Harada, T., Fujita, T.: Localisation of AFP in hepatoma tissues by immunofluorescence. *Cancer Res.* 32 162 (1972)
- 163.) Norgaard-Pedersen, B.: Alpha-1-fetoprotein in cord serum as a parameter for gestational age. *Acta paediat. Scand.* 62 167 (1973)
- 164.) Norgaard-Pedersen, B.: Alpha-1-fetoprotein and carbonic anhydratase B and C concentration in cord blood from newborn infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol. Suppl.* 182 81 (1974)

- 165.) Norgaard-Pedersen, B.: Localisation of human AFP synthesis in hepatoblastoma cells by immunofluorescence and immunoperoxidase methods. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 82 169 (1974)
- 166.) Nunez, E., Engelmann, F., Benassayag, C., Jayle, M. F.: Identification et purification préliminaire de l'alpha-fetoprotéine liant les oestrogènes dans le sérum de rats nouveau-nés. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 273 831 (1971)
- 167.) O'Connor, G. T., Tatarinov, V. S., Abelev, G. I., Uriel, J.: A collaborative study for the evaluation of a serologic test for primary liver cancer. *Cancer (Philad.)* 25 1091 (1970)
- 168.) Ohlen, J., Richter, J.: Serumkonzentrationen von alpha-1-Fetoprotein im Verlauf akuter und chronisch persistierender Hepatitiden. *Innere Medizin* 2 325 (1975)
- 169.) Okita, K., Farber, E.: Localisation of AFP by immunofluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.* 34 2758 (1974)
- 170.) Onoe, T., Dempo, K., Kaneko, A., Watabe, H.: Significance of AFP appearance in the early stage of azo-dye carcinogenesis. *Gann, Monogr. Cancer Res.* 14 233 (1973)
- 171.) Opolon, P.: Presence of circulating alpha-1-fetoprotein during acute liver atrophy. Preliminary results. *Ann. Med. Interne (Paris)* 124 883 (1973)
- 172.) Pedersen, K. O.: Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature (London)* 154 575 (1944)
- 173.) Purves, L. P.: Serum AFP: VIII Serum levels during diethylnitrosamine poisoning of baboons. *Int. J. Cancer* 10 552 (1972)

- 174.) Purves, L. R., Van der Merwe, E., Bersohn, I.: Variants of AFP
Lancet II 464 (1970)
- 175.) Purves, L. R., Bersohn, I.: Radioimmunoassay of AFP.
Proc. South. Afr. Assoc. Path. 7 67 (1969)
- 176.) Purves, L. R., Geddes, E. W.: A more sensitive test for AFP.
Lancet I 47 (1972)
- 177.) Purves, L. R., Branch, W. R., Geddes, E. W., Manso, C.: Portugal, M.
Serum AFP. VII. The range of apparent serum values in normal people,
pregnant women, and primary liver cancer high risk populations.
Cancer (Philad.) 31 578 (1973)
- 178.) Purves, L. R., Bersohn, I., Geddes, E. W.: Serum AFP and primary
cancer of the liver in man. Cancer (Philad.) 25 1261 (1970)
- 179.) Ruoslahti, E., Seppälä, M.: Studies of carcino-fetal proteins.
III. Development of a radioimmunoassay for AFP. Demonstration of
AFP in serum of healthy human adults. Int. J. Cancer 8 374 (1971)
- 180.) Ruoslahti, E., Seppälä, M., Vuopio, P., Saksela, E., Peltokallio, P.:
Radioimmunoassay of AFP in primary and secondary cancer of the liver.
J. National Cancer Inst. 49 623 (1972)
- 181.) Ruoslahti, E., Seppälä, M.: Studies of carcino-fetal proteins.
Physical and chemical properties of human AFP. Int. J. Cancer 7 218
(1971)
- 182.) Ruoslahti, E., Seppälä, M.: Normal and increased AFP in neoplastic
and nonneoplastic liver disease. Lancet II 278 (1972)
- 183.) Ruoslahti, E., Seppälä, M.: AFP in normal and pregnancy sera.
Lancet I 375 (1972)
- 184.) Ruoslahti, E., Seppälä, M.: AFP in normal human serum.
Nature (London) New Biol. 235 161 (1972)

- 185.) Ruoslahti, E., Seppälä, M., Räsänen, A., Vuopio, P., Heläke, T.:
AFP and hepatitis B antigen in acute hepatitis and primary cancer
of the liver. Scand. J. Gastroent. 8 197 (1973)
- 186.) Sakurai, M., Miyaji, T.: AFP and the morphology of hepatoma in
man. Gann, Monogr. Cancer Res. 14 185 (1973)
- 187.) Sankale, M., Masseyeff, R., Camain, R., Quenum, C., Ancelle, J. P.,
Leblanc, L.: Le diagnostic du carcinome primitif du foie par mise
en évidence dans le sérum d'une alpha-globuline embryonnaire.
Presse méd. 76 2047 (1968)
- 188.) Sananes, R., Martin, F., Nivelon, J. L., Sizaret, P., Bourdeaux, C.,
Bordes, M., Allison, M.: Etude cinétique de l'alpha-1-foeto-protéine
sérique. Arch. Franc. Péd. 30 1043 (1973)
- 189.) Sankale, M., Masseyeff, R., Teyssier, P., Leblanc, L.: Etude de la
production de l'alpha-1-foetoprotéine au cours de l'évolution du
carcinome primitif du foie. Arch. Mal. Appar. dig. 60 615 (1971)
- 190.) Sarrazin, A., Emerit, J., Bousquet, O., Lanoe, J.: Hémochromatose
avec alpha-fetoprotéine positive, un nouveau cas.
Nouv. Presse méd. 2 2602 (1973)
- 191.) Sasaki, K., Miyakawa, A., Mito, M., Kasai, Y.: Histology of hepatoma
in man with regard to AFP. Gann, Monogr. Cancer Res. 14 199 (1973)
- 192.) Sauger, F., Duval, C., Fondimare, A., Matray, F., Buffe, D.:
Systematic AFP research in 2500 sera. - Results.
Prot. biol. Fluids 18 247 (1971)
- 193.) Sell, S., Skelly, H., Leffert, H. L., Muller-Eberhard, U., Kida, S.:
Relationship of the biosynthesis of AFP, Albumin, Hemopexin, and
Haptoglobin to the growth state of fetal rat hepatocyte cultures.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 45 (1975)

- 194.) Seller, M. J., Campbell, S., Coltart, T. M.: Early termination of anencephalic pregnancy after detection by raised AFP levels. Lancet II 73 (1973)
- 195.) Seller, M. J., Singer, J. D.: Maternal serum AFP levels and pre-natal diagnosis of neural tube defects. Lancet I 428 (1974)
- 196.) Seppälä, M.: Fetal pathophysiology of human AFP Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 59 (1975)
- 197.) Seppälä, M.: Increased AFP in amniotic fluid associated with a congenital esophageal atresia of the fetus. Obstet. and Gynec. 42 613 (1973)
- 198.) Seppälä, M., Rouslahti, E.: AFP: Physiology and pathology during pregnancy and application to antenatal diagnosis. J. Perinat. Med. 1 104 (1973)
- 199.) Seppälä, M., Pihko, H., Rouslahti, E.: CEA and AFP in malignant tumors of the female genital tract. Cancer 35 1377 (1975)
- 200.) Seppälä, M., Rouslahti, E.: AFP in maternal serum: A new marker for detection of fetal distress and intrauterine death. Amer. J. Obstet. Gynec. 115 48 (1973)
- 201.) Seppälä, M., Rouslahti, E.: Radioimmunoassay of maternal serum AFP during pregnancy and delivery. Amer. J. Obstet. Gynec. 112 208 (1972)
- 202.) Seppälä, M., Bagshave, K. D., Rouslahti, E.: Radioimmunoassay of AFP: a contribution to the diagnosis of choriocarcinoma and hydatiform mole. Int. J. Cancer 10 478 (1972)
- 203.) Shinomiya, Y., Hirao, K., Matsumura, K., Imagawa, A., Enomoto, Y.: AFP during hepatocarcinogenesis in dogs treated with chemical carcinogenesis. Gann, Monogr. Cancer Res 14 301 (1973)

- 204.) Silver, H. K. B., Deneault, J., Gold, P., Thompson, W. G., Schuster, J., Freedman, S. O.: The detection of alpha-1-fetoprotein in patients with viral hepatitis. *Cancer Res.* 34 244 (1974)
- 205.) Silver, H. K. B., Gold, P., Feder, S., Freedman, S. O., Schuster, J.: Radioimmunoassay for human alpha-1-fetoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 70 526 (1973)
- 206.) Simons, M. J.: AFP and ataxia-teleangiectasia. *Lancet* I 1234 (1974)
- 207.) Simons, M. J.: Detection of AFP by radioelectrocomplexing. *Tumor Res.* 8 36 (1973)
- 208.) Smith, J. A.: Serum AFP in cystic fibrosis. *Brit. med. J.* II 544 (1975)
- 209.) Smith, J. B.: Occurrence of AFP in acute viral hepatitis. *Int. J. Cancer* 8 421 (1971)
- 210.) Smith, J. B., Barker, L. F.: Alpha-1-fetoprotein and liver specific antigen in viral hepatitis type B. *Arch. intern. Med.* 133 437 (1974)
- 211.) Spiro, R. G.: Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation, chemical composition, and physicochemical properties. *J. biol. Chem.* 235 2860 (1960)
- 212.) Stück, B., Vajaradul, C., Oberbeck, F.: Vorträge zum Thema Neonatologie. Die Bedeutung der Serumkonzentration von AFP und Immunglobulin G als Parameter des Gestationsalters. Untersuchungen bei Mangelgebo-
renen und Zwillingen. *Mechr. Kinderheilk.* 123 435 (1975)
- 213.) Talerman, A., Haije, W. G.: AFP and germ cell tumors: A possible role of Yolk sac tumor in production of AFP. *Cancer* 34 1722 (1974)
- 214.) Teres, J., Bertran, A., Mas, A.: Alpha-1-fetoprotein in Spain. *Lancet* II 465 (1970)

- 215.) Thalassinou, N. C., Lymberatos, C., Hadjioannou, J., Gardikas, C.:
Liver-cell carcinoma after long-term oestrogen-like drugs.
Lancet I 270 (1974)
- 216.) Tsuchida, Y., Ohmi, K., Endo, Y.: Embryonal carcinoma and AFP.
Gann, Monogr. Cancer Res. 14 141 (1973)
- 217.) Tsuchida, Y., Saito, S., Ishida, M., Ohmi, K., Urano, Y., Endo, Y.,
Oda, T.: Yolk sac tumor (endodermal sinus tumor) and AFP: a report
of 3 cases. Cancer (Phil.) 32 917 (1973)
- 218.) Tsukada, Y., Hirai, H.: AFP and albumin synthesis during the cell
cycle. Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 37 (1975)
- 219.) Tsukada, Y., Mikuni, M., Watabe, H., Nishi, S., Hirai, H.:
Effect of anti-AFP serum on some cultured tumor cells.
Int. J. Cancer 13 187 (1974)
- 220.) Uriel, J., de Nechaud, B., Dupiers, M.: Estrogen-binding properties
of rat, mouse and man fetospecific serum proteins. Demonstration by
immunoautoradiographic methods. Biochem. biophys. Res. Commun.
46 1175 (1972)
- 221.) Uriel, J., Loiseillier, F., Szekely, A. M., Bismuth, H.: Autoradio-
graphic localization of intracellular AFP in primary liver cancer in
man. Biomed. 21 21 (1974)
- 222.) Uriel, J., Ausseil, C., Bouillon, D., Loiseillier, F., de Nechaud, B.:
Liver differentiation and the estrogen-binding properties of AFP.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 259 119 (1975)
- 223.) Uriel, J.: Transitory liver antigens and primary hepatoma.
Prot. biol. Fluids 18 211 (1971)
- 224.) Vormittag, W.: Zytostatische immunodepressive Therapie, chromosomale
Aberrationen und karzinogene Wirkung. Wiener klin. Wschr. 86 69 (1974)

- 225.) Wada, T., Anzai, T., Yachi, A., Takahashi, A., Sakamoto, S. I.:
Incidences of three different fetal proteins in sera of patients
with primary hepatoma. Prot. biol. Fluids 18 221 (1971)
- 226.) Wahren, B., Edsmyr, F.: Fetal proteins occurring in testicular
teratoma. Int. J. Cancer 14 207 (1974)
- 227.) Wald, N., Baker, S., Peto, R., Brock, D. J. H., Bonnar, J.:
Maternal Serum AFP levels in multiple pregnancy.
Brit. med. J. III 651 (1975)
- 228.) Waldmann, T. A., McIntire, K. R.: The use of a radioimmunoassay
for AFP in the diagnosis of malignancy.
Cancer Suppl. 34 1510 (1974)
- 229.) Waldmann, T. A., McIntire, K. R.: Serum AFP levels in patients with
ataxia-teleangiectasia. Lancet II 1112 (1972)
- 230.) Weiss, W., Dittrich, H., Baumgartner, G., Ede, G., Hanek, H.,
Hentschel, E., Kahn, P., Mastnach, C., Urbanek, A.: Klinisch-prak-
tische Bedeutung der Alpha-1-Fetoprotein Bestimmung im Serum.
Imm. Med. 2 359 (1975)
- 231.) Wilkinson, E. J., Friedrich, E. G., Hosty, T. A.: AFP and endodermal
sinus tumor of the ovary. Amer. J. Obstet. Gynec. 116 711 (1973)
- 232.) Zeltzer, P. M., Neerhout, R. C., Fonkalsrud, I. W., Stiehm, E. R.:
Differentiation between neonatal hepatitis and biliary atresia by
measuring serum AFP. Lancet I 373 (1974)
- 233.) Zizkovyky, V., Masopust, J., Prokes, J.: Fetoprotein level develop-
ment in the first days of live of some mammals.
Prot. biol. Fluids 18 49 (1971)
- 234.) zit. n. 122: Tatarinov, V. S. Detection of embryospecific alpha-globulin
in the blood sera of patients with primary liver cancer. Vop. med.
Khim. 10 90 (1964)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Schönberger, Dozent an der Universitäts-Kinderklinik der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, möchte ich für seine Anleitung und Betreuung der vorliegenden Arbeit danken.

Der Direktor des Instituts für klin. Strahlenkunde der Universität Mainz, Herr Professor Dr. L. Diethelm, stellte mir einen Arbeitsplatz im Radioisotopenlabor seines Institutes zur Verfügung.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. W. Grimm, Dipl. Chem. am Institut für klin. Strahlenkunde, der wesentlich zum Zustandekommen dieser Arbeit beitrug.

Herr Götsch, Leiter des Fotolabors des Instituts für klin. Strahlenkunde, und seine Mitarbeiterinnen halfen mir in der graphischen Gestaltung.

Frl. Monika Schmidt fertigte mir zahlreiche Diagramme an.

Die Firmen Behringwerke AG und Abbott GmbH stellten AFP-Testbestecke zur klinischen Erprobung zur Verfügung.

LEBENS LAUF

Name: Alfons Roeser

Geburtsdatum: 28. Dezember 1949

Geburtsort: Engers/Rhein, Kreis Neuwied, Rhld.-Pfalz

Eltern: Josef Roeser, kaufmännischer Angestellter
Maria Roeser, geb. Backes, Hausfrau

Schulausbildung: 1956 - 1961 Kath. Volksschule Engers
1961 - 1970 Humanistisches Johannesgymnasium
Niederlahnstein

Studienverlauf: WS 1970/71 Immatrikulation an der Johannes-Guten-
berg-Universität Mainz für das Fach
Diplom-Chemie
SS 1974 Zulassung zum Studium der Human-
medizin an der Universität Köln
SS 1974 Physikum an der Universität Mainz
SS 1978 Staatsexamen für Medizin

Approbation: 30.10.78 Approbation als Arzt

Berufl. Werdegang: Jan. 1979 - Dez. 1980 als Assistenzarzt tätig bei
Herrn Prof. Dr. med. Chr. Virchow, Hochgebirgs-
klinik Davos, in den Fachgebieten Lungen- und
Bronchialheilkunde und Allergologie.
Seit 1. Jan. 1981 tätig bei Dr. Wangemann, Hinter-
zarten





